Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Zytoplasmatische Kontrolle der Histonsynthese in Hela-Zellen

In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen zur Translation von Histon-mRNA

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
JOHANNES STAHL
aus Heddinghausen

Marburg/Lahn 1978

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Zytoplasmatische Kontrolle der Histonsynthese in Hela-Zellen

In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen zur Translation von Histon-mRNA

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
JOHANNES STAHL
aus Heddinghausen

Marburg/Lahn 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 18.7.1978

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. Dr. P. Karlson
Korreferent: Prof. Dr. D. Gallwitz

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz
angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz möchte
ich für Unterstützung und anregende
Diskussion danken.

Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie,
Herrn Prof. Dr. Dr. P. Karlson, für
die Förderung der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0079

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	10
2.1.	Material	10
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Zellwachstum und Synchronisation	11
2.2.2.	Zellfraktionierung	11
2.2.3.	In-vivo-Markierung von Makromolekülen	12
2.2.4.	Präparation von ^{14}C-Markerhistonen aus HeLa-Zellen	13
2.2.5.	Präparation von Histonen aus Kalbsthymus	15
2.2.6.	Herstellung und Proteinsynthesebedingungen eines zellfreien Translationssystems aus HeLa-Zellen (HeLa-S16-System)	15
2.2.7.	In-vitro-Proteinsynthese an isolierten Polyribosomen aus HeLa-Zellen	16
2.2.8.	Präparation und Proteinsynthesebedingungen eines zellfreien Translationssystems aus Weizenkeimlingen (WG-S30-System)	17
2.2.9.	Präparation eines Retikulozytenlysats	19
2.2.10.	Präparation von Initiationsfaktoren aus Kaninchen-Retikulozyten	20
2.2.11.	Isolation von Histon-mRNA	21
2.2.12.	Isolation von Kaninchen-Globin-mRNA	24
2.2.13.	Quantitierung von Histon-mRNA im Kaninchen-Retikulozytenlysat	25
2.2.14.	Messung der Polypeptidsynthese in den In-vitro-Translationsansätzen und Vorbereitung der Proben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.15.	Proteinphosphorylierung in HeLa-S16-Extrakten	28
2.2.16.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.17.	Autoradiographie und Fluorographie	30
III.	Ergebnisse	31
3.1.	Verhalten von Histon-mRNA in synchronisierten HeLa-Zellen unter Bedingungen der Inhibition der Initiation der Proteinsynthese	31

Seite

3.1.1. Inhibierung der Histonsynthese und Stabilität der zytoplasmatischen Histon-mRNA unter hypertonen Kulturbedingungen 31

3.1.2. Lokalisation der zytoplasmatischen Histon-mRNA 37

3.1.3. Proteinsyntheseabhängigkeit der Degradation der Histon-mRNA 47

3.2. Translationseffizienz von Histon- und Globin-mRNA in zellfreien Proteinsynthesesystemen unter dem Einfluß zytoplasmatischer Extrakte aus HeLa-Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus 48

3.2.1. Translation von Histon- und Globin-mRNA im Weizenkeimlingsystem 50

3.2.2. Beeinflussung der Translationseffizienz von Globin- und Histon-mRNA in vitro durch zytoplasmatische Extrakte von HeLa-Zellen 54

3.2.3. Translationseffizienz von Histon- und Globin-mRNA in zellfreien Proteinsynthesesystemen von HeLa-Zellen 56

3.3. Vergleich der Translationseffizienz von HeLa-Histon-mRNA und Globin-mRNA unter dem Einfluß von Histonen in einem zellfreien Proteinsynthesesystem aus Weizenkeimlingen 62

3.4. Phosphorylierung zytoplasmatischer HeLa-Zellproteine unter Bedingungen der Inhibition der DNA-Replikation 66

3.4.1. Phosphorylierung von Proteinen in zellfreien Proteinsynthesesystemen von HeLa-Zellen 66

3.4.2. Phosphorylierung von Proteinen in vivo in S-Phase-Zellen und Hydroxyharnstoff-blockierten S-Phase-Zellen 70

IV. Diskussion 75

V. Zusammenfassung 85

VI. Verzeichnis der Abkürzungen 88

VII. Literaturverzeichnis 89

I. Einleitung

Eines der zentralen Probleme der gegenwärtigen biochemischen und molekularbiologischen Forschung ist die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Zelldifferenzierung. Ein Aspekt der Zelldifferenzierung ist die Regulation der Synthese spezifischer Proteine.

Während in Bakterien die Proteinsynthese nahezu ausschließlich über die Synthese von Messenger-Ribonucleinsäuren (mRNA) reguliert wird, scheint sie in höheren Organismen sowohl auf der Ebene der Transkription als auch posttranskriptionell und zytoplasmatisch reguliert zu werden.

Im Vergleich zu Prokaryonten erweist sich das Studium der Synthese spezifischer Proteine in eukaryonten Zellen als äußerst schwierig, da sie ein viel komplexeres Genom und eine vergleichsweise lange Generationszeit haben und Mutanten, die viele Untersuchungen erst ermöglichen, meist nicht zur Verfügung stehen.

Untersuchungen über die Regulation der Synthese spezifischer Proteine werden zunächst mit solchen biologischen Systemen fruchtbar sein, in denen die Synthese großer Mengen eines Proteins induziert werden kann. Solche bevorzugten Untersuchungssystheme sind die hormonell induzierter Zytodifferenzierung, wie z.B. die östrogenabhängige Ovalbuminsynthese oder die ecdysoninduzierte Synthese von Dopa-Decarboxylase, oder virusabhängige Synthese spezifischer Proteine, wie die Induktion der Globinsynthese in Friend-Leukämie Zellen.

Auch die Synthese von Histonen eignet sich für solche Untersuchungen, da die in allen eukaryonten Zellen an die DNA gebundenen Histone zeitlich gekoppelt mit der DNA-Replikation synthetisiert werden.

Kernhaltige Zellen enthalten DNA und Histone in einem Gewichtsverhältnis von ca. 1:1. Bei einer synchronen Synthese von DNA und Histonen werden daher etwa 2×10^8 Histonmoleküle in einer Zeit von 8-9 Stunden (Länge einer S-Phase) synthetisiert oder, anders ausgedrückt, 10^5 Moleküle der individuellen fünf Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 werden pro Minute in einer Zelle ge-

bildet. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht der Histone von 15 000 (etwa dem des Globins entsprechend) beträgt die Zeit, in der ein Histonmolekül bei 37°C synthetisiert wird, ca. 20 Sekunden. Wenn man weiter berücksichtigt, daß an einem mRNA-Molekül dieser Größe durchschnittlich 5 Peptidketten gleichzeitig synthetisiert werden, so kann man folgern, daß 15 Histonmoleküle pro Minute und mRNA synthetisiert werden. Um diese Syntheseleistung zu erbringen, benötigt eine Zelle ungefähr $6x10^3$ mRNA-Moleküle. Bei einer Transkriptionsgeschwindigkeit von 50 Nucleotiden pro Sekunde und ohne Berücksichtigung eventuell vorhandener hochmolekularer mRNA-Vorstufen würde eine Zelle 3 Stunden benötigen, um diese Anzahl von mRNA-Molekülen von nur einem Gen zu transkribieren.

Diese einfache Kalkulation deutet bereits darauf hin, daß eine Reiteration der Histongene für die Zelle erforderlich ist. In der Tat fand man, daß z.B. bei verschiedenen Seeigelspezies die Histongene 300-1000-fach (Kedes und Birnstiel, 1971; Weinberg et al, 1972; Grunstein, Schedl, 1976), bei Drosophila ca. 100-fach (Lifton, Goldberg, Karp und Hogness, 1978), und bei der Maus und dem Menschen ca. 20-40-fach (Jakob et al, 1976; Wilson und Melli, 1977) reiteriert sind.

Die präzise Koordination der Synthese von DNA und Histonen, der hohe Anteil von Histonen am Gesamtzellprotein und die Möglichkeit, tierische Zellen in Kultur zu synchronisieren, haben das Studium der Histonsynthese zu einem attraktiven Modell für die Aufklärung von Regulationsmechanismen der Synthese spezifischer Proteine in eukaryonten Zellen gemacht.

Borun, Scharf und Robbins(1967) zeigten, daß in synchronisierten HeLa-Zellen während der S-Phase an kleinen Polyribosomen Proteine synthetisiert werden, die sich elektrophoretisch wie die Histone verhielten. Sie isolierten außerdem eine radioaktiv markierte RNA mit einer Sedimentationskonstante von 8-9S, von der sie vermuteten, daß es sich um Histon-mRNA handelte. Gallwitz und Mueller (1969a)

bestätigen diesen Befund, indem sie die in-vivo-initiierten Peptidketten dieser Polyribosomen in einem In-vitro-System komplettierten und die so markierten Polypeptide durch vergleichende Gelelektrophorese als Histone auswiesen. Ebenfalls fanden beide Arbeitsgruppen, daß die Synthese der Histone und das Auftreten der leicht zu markierenden 8-9S polysomalen RNA streng mit der DNA-Synthese gekoppelt sind und daß die Inhibierung der DNA-Synthese mit Hydroxyharnstoff oder Cytosinarabinosid zu einer schnellen Unterbrechung der Histonsynthese und zu einem Verschwinden der 8-9S RNA von den Polyribosomen führt. Unter den gleichen Bedingungen war die Synthese anderer säurelöslicher Nichthiston-Proteine nicht betroffen. Inhibierung der RNA-Synthese in synchronisierten HeLa-Zellen in S-Phase mit Actinomycin D oder 2-Mercapto-1-(ß-4-pyridethyl)-benzimidiazol (MPB) zeigte innerhalb der ersten 30 Minuten keinen Einfluß auf die Histonsynthesekapazität der Zellen, jedoch kam es bei einer Unterbrechung der RNA-Synthese für längere Zeit zu einer Inhibierung auch der Histonsynthese (Gallwitz und Mueller, 1969b). Während Borun et al (1967) auf Grund ähnlicher Experimente auf eine kurze Halbwertszeit der Histon-mRNA von etwa 1 Stunde schlossen, zeigten Gallwitz und Mueller (1969b), daß die verwendeten Drogen bei längerer Anwendung zu einem gewissen Grad auch die DNA-Synthese hemmen, worauf zumindest teilweise die Inhibierung der Histonsynthese zurückzuführen ist. Ihre Experimente ließen deutlich erkennen, daß
1. nach Aufheben einer Hydroxyharnstoff-induzierten Unterbrechung der DNA-Replikation RNA-Synthese erforderlich ist, um mit wieder einsetzender DNA-Replikation auch eine erneute Histonsynthese zu gewährleisten und
2. die durchschnittliche Lebensdauer von Histon-mRNA zu lang ist, um die rasche Unterbrechung der Histonsynthese nach Inhibierung der DNA-Replikation erklären zu können.
Gallwitz und Mueller (1969a) folgerten daher, daß die Unterbrechung der DNA-Replikation zu einem gerichteten Instabilisierungsprozess des mRNA-Ribosomenverbandes und zu einer daraus resultierenden Degradation der Histon-mRNA führt. RNA-Synthese ist für diesen Degradationsprozess nicht er-

forderlich, da die Unterbrechung der DNA-Replikation mit Hydroxyharnstoff 15 Minuten nach Inhibierung der RNA-Synthese mit MPB ebenfalls den schnellen Stop der Histonsynthese nach sich zieht (Butler und Mueller, 1973).

Die 8-9S RNA, die zunächst wegen ihrer Größe (Histone sind Proteine mit 102-240 Aminosäuren und die Mindestgröße ihrer mRNAs beträgt daher etwa zwischen $1x10^5$ und $2,2x10^5$ Daltons) und auf Grund der zeitlichen Kopplung ihres Erscheinens im Zytoplasma mit der Histonsynthese als Histon-mRNA angesehen wurde, konnte dann von Gallwitz und Breindl (1972) und Jakob-Lorena et al (1972) als angereicherte RNA-Fraktion aus Polyribosomen von HeLa-Zellen isoliert werden. Durch Translation im Retikulozytenlysat bzw. in einem zellfreien System von Krebs-Asciteszellen identifizierten beide Arbeitsgruppen diese polysomale RNA als funktionelle Histon-mRNA.

Trotz intensiver Bemühungen ist es jedoch bisher noch nicht gelungen, Histon-mRNA aus HeLa-Zellen bis zu einem hohen Reinigungsgrad anzureichern, der es z.B. erlaubt, ihre komplementäre DNA als Hybridisierungsproben beim Studium der Histon-Biosynthese zu benutzen. Analytische und hochauflösende präperative Polyacrylamidgelelektrophoresen zeigten in den entsprechenden 5-15S RNA-Präparationen, deren einzige In-vitro-Translationsprodukte Histone sind, eine Fülle von bisher wenig charakterisierten RNA-Komponenten, die eine Reinigung von Histon-mRNA fast aussichtslos erscheinen lassen (Gallwitz und Breindl, 1972; Jakob-Lorena et al, 1972; Bos, Roskam und Gallwitz, 1976; Borun et al, 1977; Stephens et al, 1977).

Bei Seeigelembryonen, an deren Polyribosomen Kedes und Gross (1969) und Nehmer und Lindsay (1969) ähnliche RNA-Moleküle in relativ großen Mengen fanden, traf man günstigere Bedingungen für die Reinigung dieser mRNA-Spezies an. Während der schnellen Zellteilung und DNA-Replikation, die charakteristisch für die frühe Seeigelentwicklung sind, macht die Histonsynthese dort ca. 30% der gesamten Proteinsynthese aus (Kedes et al, 1969a und b; Moav und Nemer, 1971). Da der hohe Histonbedarf hier durch eine intensive Histon-mRNA-

Synthese sichergestellt wird, konnte man diese RNAs radioaktiv sehr hoch markieren und elektrophoretisch in fünf relativ reine RNA-Banden auftrennen. Die RNA einer jeden Bande wurde im zellfreien Weizenkeimlingssystem jeweils in ein Polypeptid translatiert, das in der gelelektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit einem der fünf Histonproteine entsprach (Gross et al, 1973; Levy et al, 1975; Weinberg et al, 1972; Grunstein et al, 1976; Kedes et al, 1975; Birnstiel et al, 1976).

Die gereinigten Histon-mRNA-Proben ermöglichten Arbeiten, die zur Reinigung und Charakterisierung der reiterierten Histongene mehrerer Seeigel-Spezies und von Drosophila führten (Kedes und Birnstiel, 1971; Weinberg et al, 1972; Birnstiel et al, 1974; Weinberg et al, 1975; Pardue et al, 1972; als ausführlichen Übersichtsartikel siehe auch Kedes, 1976; Lifton et al, 1978).

Auf Grund der evolutionären Stabilität der Histone (unter den 102 Aminosäuren von Histon H4 aus Kalbsthymus und Erbsenkeimlingen finden sich z.B. nur zwei konservative Aminosäurewechsel in 1,5 Milliarden Jahren (Baily und Dixon, 1973)) war es nicht überraschend, daß auch ihre mRNAs aus verschiedenen Spezies größenmäßig und in einigen anderen Charakteristika übereinstimmen. Histon-mRNA verschiedener Eukaryonten hybridisiert daher auch mit den Histongenen von Seeigeln (Kedes, Birnstiel 1971). Die Hybridisierungseffizienz dieser heterologen Systeme kann jedoch auf Grund von synonymen Codons und nicht kodierenden Regionen je nach evolutionärer Divergenz der Spezies relativ gering sein (Farquhar und McCarthy, 1973; Grunstein et al, 1976; Wilson und Melly, 1977). Es zeigte sich, daß die Histon-mRNA-Moleküle aus HeLa-Zellen, genau wie die aller anderen bisher untersuchten Spezies, kein Poly-(A)-Segment am 3'-Hydroxylende tragen (Adesnik und Darnell, 1972; Grunstein und Schedl, 1976). Eine Ausnahme wurde bei Xenopus laevis Oozyten gefunden, bei denen ein Teil der zytoplasmatischen Histon-mRNA polyadenyliert ist (Levenson und Marcu, 1976). Weiter fand man bei Säugern und Seeigeln, daß Histon-mRNAs im Gegensatz

zu anderen mRNAs innerhalb weniger Minuten nach der Synthese den Zellkern verlassen (Shut und Kedes, 1974). Nach Zugabe radioaktiver RNA-Vorstufen zu HeLa-Zellen in Kultur ist Histon-mRNA praktisch ohne Verzögerung im Zytoplasma nachweisbar (Schochetman und Perry, 1972).

Um in Säugetierzellen eine koordinierte Synthese von Histonen und DNA zu gewährleisten, scheint es einen äußerst komplizierten Regelmechanismus für die Synthese, die Translation und den Abbau der Histon-mRNA zu geben. Während des Zellzyklus erscheint die Histon-mRNA am Anfang der DNA-Replikationsphase im Zytoplasma und scheint für die Zeit der S-Phase stabil zu sein (Borun et al, 1967; Breindl und Gallwitz, 1973; Perry und Kelly, 1973). Einbaukinetiken mit ^{3}H-Uridin in Maus L-Zellen zeigten, daß die Zerfallswahrscheinlichkeit von Histon-mRNA linear mit ihrem Alter ansteigt. Dies läßt sich am besten damit erklären, daß die Histon-mRNA-Moleküle eine feste Lebenszeit von ca. 11 Stunden haben und danach mit einer Kinetik nullter Ordnung, d.h. gerichtet, abgebaut werden (Perry und Kelly, 1973). Die Tatsache, daß in HeLa-Zellen der Einbau von ^{3}H-Uridin in polysomale Histon-mRNA nur während der S-Phase und nicht nach Blockieren der DNA-Synthese mit Hydroxyharnstoff nachweisbar ist (Borun et al, 1967; Gallwitz und Mueller, 1969 und 1970; Schochetman und Perry, 1972; Breindl und Gallwitz, 1973; Perry und Kelly, 1973), führte zu der Annahme, daß die Synthese der Histon-mRNA eng mit der DNA-Synthese gekoppelt ist.

Ergebnisse von Melli et al (1977) lassen dagegen auf Grund von Crosshybridisierungsversuchen in-vivo-markierter HeLa-RNA mit Seeigel-Histongenen die Möglichkeit zu, daß die Synthese der Histon-mRNA-Vorstufen während des gesamten Zellzyklus abläuft und somit nicht an die DNA-Synthese gekoppelt ist. Wenn die DNA-Synthese mit Hydroxyharnstoff oder Cytosinarabinosid geblockt wird, ist im Zytoplasma jedenfalls keine neu-synthetisierte Histon-mRNA nachweisbar und die noch vorhandene, an Ribosomen gebundene Histon-mRNA verschwindet schnell und selektiv aus dem Zytoplasma. Die Inaktivierung der polysomalen Histon-mRNA unter diesen

Bedingungen folgt einer Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertzeit der Histon-mRNA von nur 10-13 Minuten (Gallwitz, 1975). Butler und Mueller (1973) berichteten, daß unter Cycloheximidwirkung neu-synthetisierte Histon-mRNA trotz Inhibierung der DNA-Replikation durch Hydroxyharnstoff im Zytoplasma nachweisbar ist. Diese Ergebnisse werden auch durch die Arbeit von Melli et al (1977) bestätigt. Gallwitz (1975) untersuchte die polyribosomale Histon-mRNA in Zellen, in denen die Proteinsynthese und die DNA-Replikation gleichzeitig mit Cycloheximid und Hydroxyharnstoff blockiert waren. Er fand, daß unter diesen Versuchsbedingungen die Histon-mRNA an den Polyribosomen überlebt, obwohl die DNA-Replikation durch die beiden Drogen vollständig gehemmt war. Da Cycloheximid durch Hemmung der Elongation der Proteinsynthese die Polyribosomenstruktur "einfriert", zeigen diese Ergebnisse, daß Histon-mRNA in so behandelten Zellen offensichtlich durch ihre Bindung an Ribosomen vor der Degradation geschützt wird. Zum anderen könnte dieser experimentelle Befund darauf hindeuten, daß die Inaktivierung dieser mRNA-Spezies im Zytoplasma in einer unbekannten Weise von der laufenden Proteinsynthese abhängig ist. Es wird deshalb diskutiert, daß die Degradation der Histon-mRNA am Ende der DNA-Replikation auf der Ebene der Translation, d.h. durch eine Änderung in der Wechselbeziehung zwischen Ribosomen und mRNA, kontrolliert wird.

Posttranskriptionelle Regulation der Proteinsynthese in Form von Translationskontrolle ist für mehrere pro- und eukaryontische Systeme beschrieben worden. Dabei scheint es, daß die komplexere Organisation der Eukaryonten eine Zunahme der Kontrollpunkte zwischen Transkription und fertigem Protein mit sich bringt. Durch die Regulation der Transkription kann zwar die Synthese von nicht mehr benötigter mRNA verhindert werden, aber mit einer Kontrolle auf der Ebene der Translation kann eine Zelle unter Umständen viel schneller operieren. Das scheint vor allem für Eukaryonten von Bedeutung zu sein, wo die Halbwertzeit von mRNAs mehrere Stunden beträgt (Singer und Penman, 1973;

Greenberg, 1972). Da allgemein angenommen wird, daß die Elongation und Termination von allen wachsenden Peptidketten in einer Zelle mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen (Palmiter, 1974; Lodisch, 1972), müßte sich die Inhibition der Histonsynthese auf der Stufe der Initiation abspielen, wobei grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Kontrollmechanismen denkbar sind.

Erstens, Zellen könnten allgemein den Prozess der Polypeptidketteninitiation regulieren. Auf Grund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten der mRNAs zu Ribosomen (McDowell et al, 1972; Ray und Pearson, 1975) kann dies die Translation der einzelnen mRNAs unterschiedlich stark beeinflussen (Lodish, 1974 und 1976; Kabat und Chappel, 1977). Eine Regulation der Ketteninitiationsrate könnte erreicht werden z.B. durch eine Modifizierung der Initiationsfaktoren durch Phosphorylierung (Balkow et al, 1975; Lewin et al, 1976; Farrell et al, 1977; Roberts et al, 1976; Lebleu et al, 1976; Ratner et al, 1977), durch Veränderung der monovalenten Kationenkonzentration (Saborio et al, 1974; Carrasco und Smith, 1976) oder dadurch, daß Zellen die Verfügbarkeit von mRNAs regulieren, wie z.B. durch Verpacken der mRNAs in zytoplasmatische Ribonucleoprotein-Komplexe in unbefruchteten Seeigeleiern (Gross et al, 1973; Raff et al, 1972) oder in unreifen Enten-Erythrozyten (Civelli et al, 1976).

Zweitens, Zellen könnten je nach Bedarf mRNA-spezifische Faktoren dazu benutzen, um in ein und derselben Zelle gewisse mRNAs preferentiell oder gar nicht zu translatieren. So fand man, daß nach Infektion von E. coli mit T7-Phagen z.B. ein gegen die mRNAs der Wirtszelle gerichteter Translationsrepressor synthetisiert wird (Herrlich et al, 1974). Kennedy und Heywood (1976) berichteten von mehreren spezifischen Formen des Initiationsfaktors EIF-3, die die Translation von Myosin- oder Myoglobin-mRNA im Retikulozytenlysat begünstigen. Zum anderen werden von Bakteriophagen wie Qß und f2 eigene Translationsprodukte als spezifische Faktoren benutzt, um die Translation ihrer polycistronischen RNA zu regulieren (Lodish und Zinder, 1966; Sugiyama und

Nakada, 1968; Kolakowsky und Weissmann, 1971; Bernardi und Sapho, 1972).

Ein ähnlicher Mechanismus wie im letztgenannten Fall wurde von Butler und Mueller (1973) auch für die zytoplasmatische Regulation der Histonsynthese nach Blockieren der DNA-Replikation vorgeschlagen. Auf Grund experimenteller Befunde, nach denen die Histonkonzentration nach Blockieren der DNA-Synthese im Zytoplasma ansteigt, vermuteten sie, daß die Histone durch spezifische Interaktion mit der Histon-mRNA die Initiation der Histon-Proteinsynthese inhibieren und damit die selektive Inaktivierung dieser relativ langlebigen mRNA-Spezies verursachen. Es gibt jedoch bisher keine experimentellen Befunde, die diese Annahme stützen.

Um zu einem weiteren Verständnis der zytoplasmatischen Regulation der Histonsynthese zu kommen, wurde die vorliegende Arbeit unternommen. Es wurden Untersuchungen durchgeführt
1. über das Verhalten von Histon-mRNA in synchronisierten HeLa-Zellen unter Bedingungen der Inhibition der Initiation der Proteinsynthese,
2. über die Translationseffizienz von Histon-mRNA in zellfreien Systemen unter dem Einfluß zytoplasmatischer Extrakte aus HeLa-Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus,
3. über den Einfluß von Histonen auf die Translation verschiedener mRNAs in einem zellfreien Proteinsynthesesystem und 4. über die Phosphorylierung zytoplasmatischer HeLa-Zellproteine unter dem Einfluß der Inhibierung der DNA-Replikation.

II Material und Methoden

2.1. Material

L-(3-^{3}H)Alanin (spez. Akt. 13 Ci/mmol), L-(4,5-^{3}H)Lysin (spez. Akt. 38Ci/mmol), L-(^{14}C)Lysin (spez. Akt. 280mCi/mmol), L-(4,5-^{3}H)Leucin (spez. Akt. 48Ci/mmol), (5-^{3}H)Uridin (spez. Akt. 25Ci/mmol) und (methyl-^{14}C)Thymidin (spez. Akt. 42 mCi/mmol) wurden von New England Nuclear (Dreieichenhain) bezogen.

Das Radiochemical Center (Amersham) lieferte(γ-^{32}P)ATP (spez. Akt. 17Ci/mmol) und ^{32}P als Orthophosphat (spez. Akt. 100Ci/mg Phosphor).

Weiter wurden bezogen:
Nukleosidtriphosphate, Kreatinphosphat, Kreatinphosphokinase, Cycloheximid, Ribonuclease (Rinderpankreas), Markerproteine und Actinomycin D von Boehringer (Mannheim).

Carboxymethyl-Zellulose und DEAE-Zellulose lieferte Whatman (London), Sephadex-G25 coarse und Poly(U)-Sepharose 4B die Firma Pharmacia (Uppsala) und Hydroxyharnstoff, Thymidin und Cytosinarabinosid Sigma (München).

Die Chemikalien für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurden von Serva (Heidelberg) erhalten. Alle übrigen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Die durch Verdrängung mit Protamin aus Chromatin isolierten HeLa-Zell-Histone (Methode siehe van der Westhuyzen und von Holt, 1971) waren ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz aus Marburg.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellwachstum und Synchronisation

A. Reagenzien:

Thymidin, 0,2M (steril)
Hydroxyharnstoff, 0,3M (steril)

B. Ausführung:

HeLa-S3-Zellen wurden bis zu einer Dichte von ca. $4x10^5$ Zellen/ml in Eagles minimum essential Medium, verstärkt mit 5% Kälberserum, aufgezogen. Die logarithmisch wachsenden Zellen wurden mit Thymidin oder Hydroxyharnstoff durch Blockieren der DNA-Replikation synchronisiert (Galavazi et al 1966; Breindl und Gallwitz 1973 und 1974; Adams und Lindsay, 1967). Hierzu wurden die Zellen mit frischem Medium bis zu einer Dichte von $1,5\text{-}2,0x10^5$ Zellen/ml verdünnt und Thymidin oder Hydroxyharnstoff bis zu einer Endkonzentration von 2 bzw. 1,5mM zugegeben. Nach 15 Stunden wurden die Zellen bei 37°C in einer temperierten Zentrifuge bei 800xg für fünf Minuten abzentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert. Um den Grad der Synchronisation zu erhöhen, kann nach 10 Stunden die DNA-Replikation wie beschrieben ein zweites Mal blockiert werden. Auch dieser Block wurde nach 15 Stunden aufgehoben und die Zellen danach für die angegebenen Zeiten in der S-Phase belassen. Die Synchronisation wurde in Mengen von 8 Litern Zellsuspension in 10-Literflaschen auf Magnetrührern in einem auf 37°C temperierten Raum erfolgreich ausgeführt.

2.2.2. Zellfraktionierung

A. Reagenzien:

Alle Puffer waren sterilisiert.
Waschpuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,5 - 0,5M NaCl
Lysispuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,5 - 1,5mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol

Gradientenlösungen: 15% und 40% Sucrose in 10mM Tris-HCl pH 7,5 - 2,5mM $MgCl_2$
NaCl-Lösung: 1M in Wasser

B. Ausführung:

HeLa-Zellen in Rührkultur wurden entweder vor dem Abzentrifugieren durch Gießen auf ein gleiches Volumen, bei -20°C gefrorenes Waschpuffereis abgekühlt oder direkt bei 800xg für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden darauf zweimal in eiskaltem Waschpuffer gewaschen und bis zu einer Konzentration von ca. $7x10^7$ Zellen/ml in Lysispuffer suspendiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 1-3°C durchgeführt. Nach 10minütigem Schwellen wurden die Zellen in einem Dounce-Homogenisator mit engem Pistill durch ca. 15 Auf- und Abbewegungen unter mikroskopischer Kontrolle lysiert. Das Zellhomogenat wurde 20 Minuten bei den jeweils angegebenen g-Zahlen (16 000, 20 000 oder 30 000xg) zentrifugiert, die oben schwimmende Lipidschicht durch Absaugen entfernt und der Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehoben. Die weitere Aufarbeitung dieser zytoplasmatischen Extrakte erfolgte wie unter den jeweiligen Experimenten beschrieben. In einigen Fällen wurden sie auf einen 15-40% (w/v) Sucrosegradienten geschichtet und in einem Beckman-SW27-Rotor für 3 Stunden bei 25 000xg zentrifugiert. Die Absorption der Gradienten wurde in einem Gilford 2400 Spectralphotometer gemessen, das mit einer Durchfluß Meßzelle ausgestattet war. Die jeweils angegebenen Fraktionen wurden gesammelt und nach Zufügen von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,1M mit 2 Volumen Äthanol gefällt.

2.2.3. In-vivo-Markierung von Makromolekülen

A. Reagenzien:

Trichloressigsäure: 10% bzw. 50% (w/v) in Wasser
isotonischer Puffer: 0,14M NaCl - 10mM Tris-HCl, pH 7,6
NaOH-Lösung: 1M - 0,1% Na-Dodecylsulfat

B. Ausführung:

Die Kinetik der DNA-, RNA-und Proteinsynthese in ganzen Zellen wurde gemessen, indem der Einbau von ^{14}C-Thymidin, ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Lysin in säurefällbares Material verfolgt wurde. 20 ml Zellsuspension wurden für 10-15 Minuten in 50ml konischen Flaschen gerührt, bevor die entsprechenden Chemikalien zum Blockieren der makromolekularen Synthese zugefügt wurden. Zu Beginn der Inkubation wurden die entsprechenden Isotope (2µCi ^{14}C-Thymidin, 50µCi ^{3}H-Uridin oder 100µCi ^{3}H-Lysin) zu den Kulturen gegeben und darauf alle 5 Minuten 2ml Zellsuspension entnommen. Zur Bestimmung der DNA- oder RNA-Synthese wurden die Zellen mit 4ml eiskalter 10% Trichloressigsäure-Lösung (TCA) präzipitiert. Das säurepräzipitierte Material wurde zweimal mit 10% TCA-Lösung, einmal mit 5ml Äthanol/Äther (1/1, v/v) und Äther gewaschen und getrocknet. Zur Bestimmung der Proteinsynthese wurden jeweils 2ml der Zellsuspension in 5ml eiskalten isotonischen Puffer pipettiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2ml NaOH-Lösung suspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 2ml 50% TCA-Lösung präzipitiert. Das Präzipitat wurde einmal mit 10% TCA-Lösung und weiter, wie für die übrigen Proben beschrieben, gewaschen.

Die getrockneten Pellets wurden in allen Fällen in 1ml Ameisensäure bei 40°C für 4 Stunden gelöst und je 0,8ml dieser Hydrolysate in Bray's Scintillationsflüssigkeit (Bray, G.A. 1960) gezählt.

2.2.4. Präparation von ^{14}C-Markerhistonen aus HeLa-Zellen

A. Reagenzien:

Isotonischer Puffer:	0,14M NaCl - 10mM Tris HCl, pH 7,6
Chromatographiepuffer:	0,025 LiCl - 0,05 CH_3COOLi, pH 5,1
Waschpuffer:	0,025M NH_4HCO_3 - 0,05M CH_3COONH_3, pH 6,5
Kälberserum dialysiert	gegen 0,14M NaCl - 10mM Tris HCl pH 7,6

B. Ausführung

Die Histone wurden in vivo mit ^{14}C-Lysin in S-Phase-Zellen markiert, aus den isolierten Zellkernen mit verdünnter Salzsäure extrahiert und anschließend durch Chromatographie an CM-Zellulose gereinigt.

200 ml einer Kultur von HeLa-Zellen ($2x10^5$ Zellen/ml) wurden durch Doppelblock mit Thymidin synchronisiert. Mit Entfernen des Blockes wurden die Zellen in Lysin-freies "Eagles minimum essential medium", unterstützt mit dialysiertem Kälberserum, zu einer Dichte von $4x10^5$ Zellen/ml überführt. Anschließend wurde ^{14}C-Lysin zu der Kultur (1µCi/ml) gefügt und die Zellen sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in hypotonem Puffer lysiert (siehe 2.2.2.). Aus dem Lysat wurden durch Zentrifugation bei 800xg für 10 Minuten die Zellkerne gewonnen, die anschließend zweimal in isotonischem Puffer gewaschen wurden.

Die Kerne wurden in doppelt destilliertem Wasser suspendiert, die Suspension durch Zugabe von 1N HCl auf 0,25N HCl gebracht und für zwei Stunden gerührt. Der Säureextrakt wurde nach 10 minütiger Zentrifugation bei 27 000xg etwa 12 Stunden gegen 500 Vol. 0,1N HCl dialysiert und die Histone mit 10 Vol. Aceton bei -20°C für 15 Stunden gefällt. Das Präzipitat wurde 15 Minuten bei 27 000xg abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Histonpräparation wurde zur Abtrennung von Fremdproteinen in Chromatographiepuffer gelöst und an einer Carboxy-Methyl-Zellulose-Säule absorbiert. Nichthiston-Proteine wurden mit etwa 20 Säulenvolumen Chromatographiepuffer eluiert, die Li^+-Ionen anschließend durch Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die gebundenen Histone wurden mit 0,2N HCl eluiert und mit 10 Vol. Aceton bei -20°C über Nacht gefällt. Die Histone wurden abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Aceton gewaschen, in Probenpuffer (siehe 2.2.14.) gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.5. Präparation von Histonen aus Kalbsthymus

A. Reagenzien

Homogenisationspuffer: 0,25M Sucrose - 10mM $MgCl_2$ - 25 mM KCl - 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, vor Gebrauch wurden 50mM $NaHSO_3$ zugesetzt

Waschpuffer: 0,14mM NaCl - 50mM $NaHSO_3$

B. Ausführung

Tiefgefrorener Kalbsthymus wurde in Mull zerschlagen und die Gewebestückchen anschließend in Homogenisationspuffer aufgetaut. Das Gewebe wurde zuerst mit einer Schere und dann mit etwa 10 Vol. Homogenisationspuffer im Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert. Nach Filtration durch sechs Lagen Mull wurden die Zellkerne für fünf Minuten bei 1000xg abzentrifugiert. Die Kerne wurden darauf viermal durch Homogenisation mit Waschpuffer im Potter-Homogenisator gewaschen und zur Isolation der Histone wie unter 2.2.4. beschrieben weiter behandelt. Die Proteinbestimmung der fertigen Histonpräparation wurde nach Lowry (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt.

2.2.6. Herstellung und Proteinsynthesebedingungen eines zellfreien Translationssystems aus HeLa-Zellen (HeLa-S16-System)

A. Reagenzien:

Lysispuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,6 - 1,5mM $MgCl_2$ 6mM 2-Mercaptoäthanol

konzentrierter Puffer: 0,260M Tris-HCl, pH 7,6 - 0,600M KCl - 24,5mM $MgCl_2$ - 42mM 2-Mercaptoäthanol

Aminosäure-Energiemix: 0,500mM unmarkierte Aminosäuren (20- der ^3H-markierten) - 6,2mg/ml ATP - 1,2mg/ml GTP - 50,5mg/ml Creatinphosphat - 60µg/ml Creatin-

	kinase - je 1mCi/ml der ^{3}H-markierten Aminosäuren
Initiationsfaktoren: (aus Kaninschen-Retikulozyten)	3,4A_{260}-Einheiten in 10mM Tris-HCl, pH 7,6 - 0,350M KCl - 1mM $MgCl_2$ - 6mM 2-Mercaptoäthanol

B. Ausführung

Ein zellfreier Extrakt aus HeLa-Zellen wurde im Prinzip nach früher publizierten Methoden (Mathus und Korner, 1970; Aviv et al, 1971; McDowell et al, 1972) hergestellt. Bei den hier benutzten Extrakten wurde auf Vorinkubation und Chromatographie über Sephadex verzichtet. Um eine deutliche Stimulierung der Translationsaktivität durch exogene mRNAs zu erreichen mußten dem System Initiationsfaktoren aus Kaninchen-Retikulozyten zugesetzt werden. Die HeLa-Zellen wurden, wie unter Abschnitt 2.2.2. beschrieben, bei einer Konzentration von $7x10^7$ Zellen/ml in Lysispuffer lysiert und von dem Zellhomogenat ein 16 000xg zytoplasmatischer Überstand durch Zentrifugation hergestellt. Der Extrakt wurde entweder sofort für Proteinsyntheseexperimente weiter verwendet oder durch Eintropfen in flüssige Luft tief gefroren und die so erhaltenen etwa 40µl großen Perlen in dem selben Milieu gelagert.

Die Translation wurde bei 30°C in offenen Glasgefäßen in 50µl-Ansätzen folgender Zusammensetzung durchgeführt: 30mM Tris-HCl, pH 7,6 - 95mM KCl - 3mM $MgCl_2$ - 6mM 2-Mercaptoäthanol - 1mM ATP - 2mM GTP - 15mM Creatinphosphat - 6µg Creatinkinase - je 5µCi der ^{3}H-markierten Aminosäuren - 50µM der unmarkierten Aminosäuren - die unter den jeweiligen Versuchen angegebenen Mengen HeLa-S16-Extrakt.

2.2.7. In-vitro-Proteinsynthese an isolierten Polyribosomen aus HeLa-Zellen

A. Reagenzien

Inkubationspuffer: 50mM Tris-HCl, pH 7,6 - 5mM $MgCl_2$ - 50mM NH_4Cl_2 - 5mM 2-Mercaptoäthanol

Energiemix: 10mM ATP - 2mM GTP - 100mM Creatinphosphat - 400µg Creatinkinase - 1mCi/ml L-(4,5 ^{3}H) Lysin

B. Ausführung

Die in-vivo-initiierten Polypeptidketten der Polyribosomen wurden nach einer von Gallwitz und Mueller (1969) beschriebenen Methode in-vitro kompletiert. Hierzu wurden die Polyribosomen der 20 000xg zytoplasmatischen Überstände aus HeLa-Zellen (siehe Abschnitt 2.2.2.) durch Zentrifugation für 60 Minuten bei 110 000xg pelletiert. Die Mikrosomen wurden in Inkubationspuffer suspendiert (Dounce-Homogenisator) und größere Agregate durch Zentrifugation bei 12 000xg entfernt. Das mittlere Drittel des 110 000xg Überstandes von Zellen aus der Mitte der S-Phase wurde ebenfalls gepoolt und diente in den In-vitro-Ansätzen als Enzym-und t-RNA-Spender.

Ein ml eines Proteinsyntheseansatzes enthielt in wässriger Lösung: 50mM Tris-HCl, pH 7,6 - 50mM NH_4Cl - 5mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol, Polyribosomen entsprechend 1,5mg Protein (nach Lowry), 110 000xg Supernatant entsprechend 0,5mg Protein (nach Lowry) und 100µl Energiemix.
Die Ansätze wurden 20 Minuten in offenen Glasgefäßen bei 37° in einem Wasserbad inkubiert und wie unter Abschnitt 2.2.14. beschrieben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese vorbereitet.

2.2.8. Präparation und Proteinsynthesebedingungen eines zellfreien Translationssystems aus Weizenkeimlingen (WG-S30-System)

A. Reagenzien:

Alle Lösungen waren steril.
Extraktionspuffer: 20mM Hepes, pH 7,5 (eingestellt mit KOH) - 0,1mM KCl - 1mM Mg $(CH_3COO^-)_2$ - 2mM $CaCl_2$ - 6mM 2-Mercaptoäthanol
Chromatographiepuffer: 25mM Hepes, pH 7,5 - 125mM KCl - 5mM Mg $(CH_3COO^-)_2$ - 6mM 2-Mercaptoäthanol

Sephadex G25 coarse, autoklaviert
Aminosäure-Energiemix: siehe 2.2.6.
konzentrierter Puffer: 750mM KCl - 200mM Hepes, pH 7,5 - 72mM 2-Mercaptoäthanol - 1mM Spermin HCl
Polyäthylenglykol-Lösung: 300mg/ml Polyäthylenglykol (MG 6000) in Wasser

B. Ausführung:

Das WG-S30-System wurde nach einer von Marcu und Dudock (1974) beschriebenen Methode hergestellt. Alle Präparationsschritte wurden bei 1-3°C durchgeführt.
4g Weizenkeimlinge wurden mit 4g feingepulvertem Glas 45-60 Sekunden lang in einem vorgekühltem Mörser kräftig zerrieben. Es wurde 8ml Extraktionspuffer zugefügt und nochmals für 30 Sekunden gut zermörsert. Der Zellaufschluß wurde mit einem sterilen Spatel in ein Zentrifugenglas gekratzt und für 15 Minuten bei 30 000xg abzentrifugiert. Nach Entfernen der oben schwimmenden Lipidschicht wurde der Überstand (ca 4ml) über eine Säule von Sephadex-G25-coarse (2cmx15cm) gegeben, die mit Chromatographiepuffer äquilibriert war. Bei einer Durchflußrate von 3ml/Minute wurden Fraktionen von 1ml gesammelt und alle Fraktionen, die weniger als $80A_{260}$ Einheiten enthielten, verworfen. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und nochmals für 15 Minuten bei 30 000xg zentrifugiert. Die Absorption des fertigen Extrakts betrug $95A_{260}$ Einheiten bei 260nm und 60 Einheiten bei 280nm. Der Extrakt wurde durch Eintropfen in flüssigen Stickstoff zu kleinen Perlen eingefroren und bei -80°C gelagert. Um ein gut aktives Translationssystem zu erhalten, muß die gesammte Herstellung so schnell wie möglich erfolgen und sollte nicht länger als ca 75 Minuten vom Aufschluß der Keimlinge bis zum Einfrieren des Extraktes dauern.

Die Translation von mRNAs im WG-S30-System wurde in offenen Glsgefäßen bei 30°C in Ansätzen von 50µl Gesamtvolumen durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt: 20mM Hepes pH 7,5 - 2mM $Mg(CH_3COO^-)_2$ - 87,5mM KCl - 6mM 2-Mercaptoäthanol - 0,1mM

Spermin HCl - 1mM ATP - 0,2mM GTP - 15mM Creatinphosphat - 6µg Creatinkinase - 50µM der unmarkierten Aminosäuren - je 5µCi der ^{3}H-markierten Aminosäuren - 1,5mg PEG - 0,1mM Spermin - 2 A_{260} Einheiten Weizenkeimlingsextrakt.

Gestartet wurde die Reaktion durch Auffüllen der Ansätze mit der entsprechenden mRNA, gelöst in Wasser, zu einem Endvolumen von 50µl und Überführung der Proben in ein thermostatisiertes Wasserbad. Die benötigte Menge WG-S30-Extrakt wurde erst unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, da die Aufbewahrung des aufgetauten Extrakts, selbst im Eisbad, in einem sehr schnellen Aktivitätsverlust resultierte.

2.2.9. Präparation eines Retikulozytenlysats

A. Reagenzien:

Phenylhydrazin-HCl, 2,5% (w/v) neutralisiert mit NaOH. Die Lösung wurde in passenden Portionen eingefroren und bei -20°C gelagert.
Pentobarbital-Na, 50mg/ml
Heparin (Liquemin^{R}, Roche) 5000USP Einheiten/ml
Waschpuffer: 0,14M NaCl - 5mM KCl - 5mM $MgCl_2$
Lysislösung: 2mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol - 50mM Hämin

B. Ausführung:

Die Herstellung des Lysats richtete sich im wesentlichen nach herkömmlichen Methoden (Adamson et al, 1968; Gilbert und Anderson, 1970).

Kaninchen von 2-3kg Gewicht wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen subkutan 0,3ml Phenylhydrazinlösung/kg Körpergewicht verabreicht. Unter Pentobarbitalanästhesie wurden die Tiere am siebten Tag ausgeblutet. Dazu wurde ihnen eine Mischung von Pentobarbital (1ml/kg) und Heparin (1000E./kg) intravenös (Ohrvene) injeziert und nach Aufschneiden der rechten Herzkammer das Blut aus der Brusthöhle abgesaugt. Hierbei wurde eine Ausbeute von 80-100ml Blut/Tier erreicht, das anschließend durch vier Lagen Mull filtriert wurde. Alle

weiteren Schritte wurden bei 1-3°C durchgeführt. Die Blutzellen wurden 10 Minuten bei 6 000xg abzentrifugiert und viermal mit fünf Volumen Waschpuffer gewaschen. Zum Lysieren wurden sie anschließend in zwei Volumensteilen Lysispuffer suspendiert und ca fünf Minuten im Eisbad gerührt. Die Zellreste des Lysats wurden durch Zentrifugation bei 15 000xg für 15 Minuten entfernt.

Das Lysat wurde in kleinen Portionen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.10. Präparation von Initiationsfaktoren aus Kaninchen-Retikulozyten

A. Reagenzien:

Alle Lösungen waren steril.

Lysislösung:	2mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol
Sucroselösung:	1,5M Sucrose - 0,15M KCl - 2mM $MgCl_2$
Polyribosomen-Suspensionspuffer:	5mM Tris-HCl, pH 7,6 - 0,25M Sucrose - 5mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol
Verdünnungspuffer:	10,5mM Tris-HCl, pH 7,6 - 0,55mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol
Chromatographiepuffer:	10mM Tris-HCl, pH 7,6 - 50mM KCl - 1mM $MgCl_2$ - 2-Mercaptoäthanol
Elutionspuffer:	10mM Tris-HCl, pH 7,6 - 0,35M KCl - 1mM $MgCl_2$ - 5mM 2-Mercaptoäthanol

B. Ausführung:

Um eine gute Proteinsyntheserate in zellfreien Systemen aus HeLa-Zellen oder Retikulozyten zu erhalten, müssen diese

meistens mit Initiationsfaktoren unterstützt werden. Eine nicht näher gereinigte Präparation von Initiationsfaktoren wurde aus Kaninchen-Retikulozyten durch Waschen von Polyribosomen mit einer 0,5M KCl-Lösung hergestellt. Retikulozyten wurden aus Kaninchen gewonnen und in Lysislösung lysiert wie unter Abschnitt 2.2.9. beschrieben. Alle folgenden Schritte wurden bei 1-3°C durchgeführt. Nach der Lysis wurden 0,2 Volumen Sucroselösung zugegeben und die Zellreste durch Zentrifugation bei 20 000xg für 15 Minuten entfernt. Aus dem Überstand wurden die Polyribosomen durch Zentrifugation für zwei Stunden bei 120 000xg pelletiert und anschliessend zu einer Konzentration von ca $200A_{260}$ Einheiten/ml in Polyribosomen-Suspensionspuffer resuspendiert (Dounce-Homogenisator). Zu dieser Suspension wurde tropfenweise eine 4M KCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5M KCl unter Rühren zugegeben. Nach weiterem 10 minütigen Rühren wurde der Extrakt für zwei Stunden bei 240 000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Verdünnungspuffer bis zu einer Endkonzentration von 50mM KCl verdünnt und dann auf eine DEAE-Cellulose Säule getragen, die gegen Chromatographiepuffer äquilibriert war (3cmx5cm Säule für einen Waschextrakt von 4 $000A_{260}$ Einheiten Polyribosomen). Die Säule wurde mit Chromatographiepuffer gewaschen, bis im Durchfluß kein Protein mehr nachweisbar war. Die Initiationsfaktoren wurden dann mit Elutionspuffer von der Säule gewaschen, die Fraktionen, die mehr als $3A_{260}$ Einheiten enthielten, wurden gepoolt und in flüssigem Stickstoff in kleinen Perlen eingefroren. Die Konzentration der Initiationsfaktoren wurde mit $3,4A_{260}$ Einheiten/ml bestimmt.

2.2.11. Isolation von Histon-mRNA

A. Reagenzien:

Alle Puffer waren steril.
Detergenspuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,5 - 0,15M KCl - 2mM $Mg(CH_3COO^-)_2$ - 0,1% Triton X-114
Na-Dodecylsulfat: 10% in Wasser
Proteinase K: 10mg/ml Lysispuffer

Gradientenlösungen: 15 und 30% Sucrose (w/v) in 20mM Tris-HCl, pH 7,7 - 1mM EDTA - 0,1M NaCl - 0,25% Na-Dodecylsulfat (w/v)

Poly(U)-Equilibrierungspuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,6 - 0,5% NaCl - 0,1% Na-Dodecylsulfat (w/v)

B. Ausführung:

HeLa-Zellen wurden drei bis vier Stunden nach Entfernen eines doppelten Thymidin-Blocks, wie unter Abschnitt 2.2.2. beschrieben, geerntet, gewaschen und lysiert. Anschließend wurde ein 16 000xg zytoplasmatischer Überstand hergestellt, der mit einer 10%igen Lösung auf 0,5% Na-Dodecylsulfat gebracht wurde. Dann wurde der Zellextrakt bis zu einer Konzentration von 0,2mg/ml mit Proteinase K versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Inkubat mit einem gleichen Volumen wassergesättigten Phenol 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur intensiv ausgeschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000xg getrennt. Die wässrige Phase wurde weiter jeweils mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroformgemisch (1:1,v/v) und Chloroform extrahiert und bis zu einer Endkonzentration von 0,1M mit NaCl versetzt. Hieraus wurde die RNA mit zwei Volumenteilen Äthanol bei -20°C über Nacht gefällt.

Darauf wurde die RNA abzentrifugiert und das erhaltene Pellet zuerst mit einer kleinen Menge Acetatpuffer pastenartig mit einem sterilem Glasstab verrührt. Dann wurde mit Acetatpuffer bis zu einem Endvolumen von ca. 10ml versetzt und nach 10-minütigem Stehen die RNA wieder abzentrifugiert. Dieser Vorgang diente dazu, die 4 und 5S RNA auszuwaschen und wurde noch einmal wiederholt. Die RNA wurde dann in sterilem Wasser gelöst und mit zwei Volumenteilen Äthanol gefällt. Danach wurde die RNA wieder abzentrifugiert und in 10mM Tris-HCl, pH 7,6 - 0,25% Na-Dodecylsulfat zu einer Konzentration von 150 A_{260} Einheiten/ml aufgelöst. Je 1ml dieser Lösung wurde auf 35ml eines 15-30%igen Sucrosegradienten geschichtet und

bei 20°C für 38 Stunden bei 23 000rpm in einem Beckman-SW27-Rotor zentrifugiert. Die Gradienten wurden danach durch eine Durchflußzelle eines Gilfort-Spektralphotometers gepumpt und die Absorption bei 260nm gemessen. Die RNA, die zwischen 5 und 15S sedimentierte, wurde gepoolt und mit Äthanol gefällt.

Für den nächsten Reinigungsschritt wurde die RNA abzentrifugiert und in Poly(U)-Equilibrierungspuffer aufgelöst. Dann wurde sie über eine Poly(U)Sepharosesäule (0,8x5cm) gegeben, die äquilibriert war mit dem selben Puffer. Die nicht gebundene RNA-Fraktion (Histon mRNA hat kein Poly(A)-Stück am 3'Hydroxylende und befindet sich daher hier im Durchlauf) wurde mit einem gleichen Volumen doppelt destillierten Wasser verdünnt und die RNA mit Äthanol gefällt.
Diese Poly(A)(-)-RNA-Fraktion wurde noch einmal durch eine Sucrosegradientenzentrifugation gereinigt, die 5-15S RNA in von Glas doppelt destilliertem Wasser gelöst und in kleinen Portionen bei -20°C gelagert.

In Experimenten, in denen der Histon mRNA-Gehalt verschieden behandelter Zellen verglichen werden sollte, wurde die Histon mRNA wie folgt isoliert.
Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Konzentration von $5x10^7$ Zellen/ml in Detergenspuffer durch 8-10 Stöße in einem Dounce-Homogenisator lysiert. Nach Zentrifugation bei 16 000 xg wurde der zytoplasmatische Überstand auf 1% Na-Dodecylsulfat eingestellt und,wie oben beschrieben, mit Phenol und Chloroform extrahiert. Aus der wässrigen Phase wurde die RNA über Nacht mit Äthanol gefällt und nach dem Abzentrifugieren in der beschriebenen Weise über Poly(U)-Sepharose gegeben, um poly(a)-haltige RNA abzutrennen. Die RNA wurde hiernach wiederum mit Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Vakuum getrocknet, anschließend in genau 1ml sterilem Wasser aufgelöst und die Absorption bei 260nm bestimmt (entspricht dem Wert a in Abschnitt 2.2.13.). Die Proben wurden hiernach durch Zentrifugation über 15-30% Sucrosegradienten aufgetrennt. Die 5-15S RNA wurde gepoolt, mit Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wur-

de im Vakuum getrocknet (ca. fünf Minuten), in 250ul Wasser aufgelöst und bei -20°C gelagert. Die beschriebene Methode erlaubte es, bis zu 10 histon-mRNA-Präparationen aus unterschiedlich behandelten HeLa- Zellkulturen gleichzeitig und unter reproduzierbaren Bedingungen zu isolieren.

2.2.12. Isolation von Kaninchen-Globin-mRNA

A. Reagenzien:

Lysispuffer: 2mM $MgCl_2$ - 0,1mM EDTA - 2mM UTP - 50ug/ml Dextransulfat - 5mM 2-Mercaptoäthanol
Na-Dodecylsulfat: 10% in Wasser (w/v)
Tris-HCl: 1M, pH 9
Poly(U)-Equilibrierungspuffer und -Elutionspuffer siehe Abschnitt 2.2.8.

B. Ausführung:

Aus 5 Kaninchen wurden, wie unter Abschnitt 2.2.9. beschrieben, Retikulozyten gewonnen, gewaschen und in 250ml Lysispuffer lysiert. Die Zellfragmente, Zellkerne und Mitochondrien wurden bei 16 000xg und 0°C abzentrifugiert und der zytoplasmatische Überstand mit konzentrierten Lösungen auf 0,5% Na-Dodecylsulfat und 50mM Tris-HCl, pH 9 eingestellt. Hieraus wurde nach Phenol-, Phenol-Chloroform 1:1 (v/v)-und Chloroform-Extraktion gesamt zytoplasmatische RNA isoliert. Diese RNA wurde in Poly(U)-Equilibrierungspuffer aufgenommen und auf eine Poly(U)-Sepharosesäule aufgetragen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Die Säule wurde bei Zimmertemperatur mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis der Durchlauf keine Absorption bei 260nm mehr zeigte. Dann wurde die poly(A)-haltige RNA bei 45°C mit Elutionspuffer eluiert und nach Zufügen von NaCl bis zu einer Konzentration von 0,1M mit Äthanol gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation über einen 15-30%igen Sucrose Gradienten (Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.11.) aufgetrennt und der 9S-Peak gesammelt. Die RNA dieser Fraktion wurde mit Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde leicht getrocknet und in doppelt

destilliertem Wasser (ca. $20A_{260}$ Einheiten/ml) aufgelöst. Die Globin mRNA-Präparation wurde in kleinen Portionen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.13. Quantitierung von Histon-mRNA im Kaninchen-Retikulozytenlysat

A. Reagenzien:

konzentrierter Puffer:	10mM $MgCl_2$ - 650mM NH_4Cl - 90mM Tris-HCl, pH 7,6 - 5mM 2-Mercaptoäthanol
Aminosäure-Energiemix:	10mM ATP - 2mM GTP - 150mM Creatinphosphat - 600 µg/ml Creatinkinase - 0,5mM 19 unmarkierte Aminosäuren - 800µCi/ml ^{3}H-Lysin
RNase A:	1mg/ml in Wasser
EDTA:	0,1M in Wasser, pH 7,6 (eingestellt mit NaOH)
HCl:	0,5, 0,25, 0,1N in Wasser
Tris-Harnstoffpuffer:	0,1M Tris-HCl, pH 7,6 - 6M Harnstoff
HCl-Harnstoffpuffer:	0,25N HCl - 6M Harnstoff

B. Ausführung:

Die Methode, mit der die Menge biologisch aktiver Histon-mRNA auf Grund ihrer Translationskapazität im Retiklozytenlysat bestimmt wurde, wurde von Breindl und Gallwitz (1974) und Gallwitz (1975) beschrieben.
Die Translation der mRNAs wurde routinemäßig in Testansätzen zu 350µl folgender Zusammensetzung durchgeführt: 170µl Retikulozytenlysat, 35µl Aminosäure-Energiemix, 35µl konzentrierter Puffer, 35µl Kaninchen Initiationsfaktoren (siehe 2.2.10) und 75µl RNA, gelöst in Wasser.
Die Ansätze wurden in geschlossenen Glasgefäßen bei 26°C für 45 Minuten inkubiert. Die Translation wurde durch Zugabe von EDTA und RNase A bis zu einer Endkonzentration von 10mM bzw. 20µg/ml gestoppt und die Inkubation für weitere 15 Minuten bei 26°C fortgesetzt. Alle folgenden Schritte wurden bei 1-3°C durchgeführt. Zu den Inkubationsansätzen wurde ein gleiches

Volumen 0,5N kalte HCl unter Rühren tropfenweise zugefügt und dann das Volumen der Ansätze mit 0,25N HCl auf 1ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang intensiv geschüttelt und anschließend bei 20 000xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, der die säurelöslichen Polypeptide enthielt, wurde für drei bis vier Stunden gegen 0,1N HCl dialysiert und aus dem Dialysat die Polypeptide mit 9 Volumensteilen Aceton bei -20°C über Nacht gefällt.

Das Präzipitat wurde für 10 Minuten bei 15 000xg abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in 1ml Tris-Harnstoffpuffer gelöst. Diese Lösung wurde über eine Säule (0,5cm x5cm) aus CM-Cellulose gegeben, die vorher mit Tris-Harnstoffpuffer equilibriert war. Hierbei passiert Globin ungehindert die Säule (CM-1 Fraktion), wogegen Histone quantitativ an den Austauscher gebunden werden und anschließend mit HCl-Harnstoffpuffer eluiert werden (CM-2 Fraktion). Während der Säulenchromatographie wurden Fraktionen von 1,8ml gesammelt und 50µl einer jeden Fraktion in Scintilationsgefäße, die 0,4ml Wasser enthielten, pipettiert. Hierzu wurden 6ml Pray's Scintilationsmischung (Bray 1960) gefügt, gemischt und die Radioaktivität gezählt. Alle über dem Background liegenden cpm-Werte der einzelnen Fraktionen einer jeweiligen CM-Fraktion wurden addiert (cpm in CM-1 bzw. CM-2) und der mRNA-Gehalt der eingesetzten Präparation nach dem Ausdruck (A-B)/a berechnet. Hierbei stehen A und B für den Ausdruck (cpm in CM-2/cpm in CM-1)x100, wobei für A jeweils die Werte aus dem Translationsansatz mit zugesetzter Histon mRNA eingesetzt wurden und für B die aus dem Translationsansatz ohne exogene mRNA (Nullwertkontrolle). a steht für die Konzentration, gemessen in A_{260} Einheiten/ml, der Histon mRNA-Präparation vor dem Reinigungsschritt durch Sucrosegradientenzentrifugation (siehe 2.2.11.).

2.2.14. Messung der Polypeptidsynthese in den In-vitro-Translationsansätzen und Vorbereitung der Proben für die Polyacrylamidgelelektrophorese

A. Reagenzien:

Trichloressigsäure:	20% (w/v) in Wasser
RNase A:	1mg/ml in Wasser
EDTA:	0,1M, pH 7,6 (eingestellt mit NaOH)
Probenpuffer (2x konzentriert):	0,125N Tris-HCl, pH 6,8 - 4% Na-Dodecylsulfat (w/v) - 20% Glycerin (w/v) - 10% 2-Mercaptoäthanol (v/v)

B. Ausführung:

Die In-vitro Proteinsynthese wurde durch schnelles Abkühlen der Proben auf 0°C in einem Eisbad abgebrochen. Die Proteinsyntheserate wurde durch Messen des Einbaus von ^{3}H-markierten Aminosäuren in Trichloressigsäure (TCA) fällbares Material bestimmt. Hierzu wurden 5-20µl der Ansätze auf Whatman 3MM Filterplättchen (1,5cm Kantenlänge) pipettiert, die mit 20% TCA getränkt waren. Beim Weizenkeimlingsystem erhielten wir reproduzierbarere Ergebnisse, wenn die Translationsansätze vorher mit einem gleichen Volumen eiskaltem Wasser verdünnt wurden. Die Filterplättchen wurden an der Luft getrocknet und für 20 Minuten in eiskalte 20% TCA gegeben (die hohe Konzentration an TCA war nötig, um die basischen Histonproteine quantitativ zu fällen). Anschließend wurde die TCA-Lösung erneuert und mit den Filterplättchen für 20 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Plättchen wurden noch zweimal in frischer TCA-Lösung bei 20°C gewaschen, dann zweimal in 96%igem Äthanol, einmal in einem Äthanol/Äthergemisch (1:1, v/v) und abschließend zweimal in Äther. Darauf wurden sie an der Luft getrocknet und in einer Scintilationsflüssigkeit auf Toluolbasis gezählt.

Für die Auftrennung der Polypeptide auf Polyacrylamidgelen wurden die Inkubationsansätze mit EDTA und RNase A bis zu

einer Endkonzentration von 10mM bzw. 50µg/ml versetzt. Die Proben wurden noch einmal bei 30°C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert und mit einem gleichen Volumen doppelt konzentrierten Probenpuffer versetzt. Nach einem kurzen Erhitzen auf 95°C (ca. eine Minute) konnten die Proben direkt auf die Gele aufgetragen werden.

2.2.15. Proteinphosphorylierung in HeLa-S16-Extrakten

A. Reagenzien:

Ribosomenpuffer: 100mM KCl - 3mM $MgCl_2$ - 20mM Tris-HCl, pH 7,5 - 6mM 2-Mercaptoäthanol

B. Ausführungen:

Die Phosphorylierung der Proteine in S16-Extrakten wurde für die jeweils angegebenen Zeiten unter Proteinsynthesebedingungen in 50µl Ansätzen bei 30°C durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt: 30mM Tris-HCl, pH 7,6 - 95mM KCl - 3mM $MgCl_2$ - 6mM 2-Mercaptoäthanol - 1mM (γ-^{32}P)ATP (spezifische Aktivität nach Verdünnung 100mCi/ml) - 0,2mM GTP - 15mM Creatinphosphat - 3µg Creatinkinase - 50µM der 20 unmarkierten Aminosäuren und die unter den jeweiligen Versuchen angegebenen Mengen an HeLa-S16-Extrakten. Einige Ansätze wurden zudem noch mit ribosomalen Waschfraktionen unterstützt, die wie folgt präpariert wurden. Aus den entsprechenden HeLa-S16-Extrakten wurden durch Zentrifugation bei 100 000xg und 1°C für 90 Minuten die Polyribosomen pelletiert. Die Polyribosomenpellets wurden in einem Dounce-Homogenisator zu einer Konzentration von 190A_{260} Einheiten/ml in Ribosomenpuffer suspendiert. Zu den Homogenisaten wurden im Eisbad tropfenweise unter Rühren ein zehntel der Volumina einer 4M KCl-Lösung gegeben und das ganze für weitere 15 Minuten bei 1°C gerührt. Dann wurden diese Lösungen bei 200 000xg für 2,5 Stunden zentrifugiert und die Überstände (RWF) bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.16. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

A. Reagenzien:

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid - 0,8% (w/v) N,N'-Bismethylenacrylamid
Tris-HCl-Puffer: 1,5M, pH 8 und 0,5M, pH 6,8
Na-Dodecylsulfat: 10% (w/v) in Wasser (SDS)
Ammoniumpersulfat: 10% (w/v) in Wasser (vor Gebrauch frisch zuzubereiten)
N,N N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)
Elektrophoresepuffer: 0,77M Glycin - 0,1M Tris - 0,4% SDS
Vor Gebrauch wurde 1 Volumen Puffer mit 3 Volumen Wasser verdünnt.
Amidoschwarzlösung: 0,1% Amidoschwarz (w/v) - 40% Methanol (v/v) - 10% Essigsäure (v/v)

B. Ausführung:

Die Auftrennung der radioaktiv markierten Polypeptide wurde aus SDS-Polyacrylamidgelen nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode vorgenommen. Da die Auswertung der Gele autoradiographisch (^{32}P) oder fluorometrisch (^{3}H) erfolgte, wurde hier die Form der Plattengele gewählt, die dazu die vergleichende Analyse vieler Proben gleichzeitig (hier bis zu 13) ermöglichte. Das Trenngel war 10cmx15cmx0,13cm (20ml) und das Sammelgel 2cmx15cmx0,13cm (4ml) groß.
Die Plattengele wurden nach der Anleitung von Studier (1973) hergestellt. Die entsprechende Menge Acrylamidlösung, 5ml Trispuffer, pH 8,8 - 0,2ml SDS-Lösung und 0,2ml Ammoniumpersulfatlösung wurden mit Wasser zu 20ml aufgefüllt, 10µl TEMED hinzugefügt und diese Lösung zwischen zwei Glasplatten, die an den Seiten und unten mit 1,3mm dicken Plastikstäben auseinander gehalten und von außen durch Polymerisieren einer 2%iger Agaroselösung abgedichtet wurden, gegossen und unter einer dünnen Wasserschicht polymerisieren gelassen. Danach wurde hierauf ein Pregel gegossen, das aus einer Mischung der entsprechenden Menge Acrylamidlösung, 1ml Trispuffer, pH 6,8 - 40µl SDS-Lösung und 4µl TEMED in einem Endvolumen

von 4ml bestand. Durch das Einpolymerisieren eines Kamms in das Sammelgel wurden 13 je 6mm weite Taschen geformt. Nach ca 1,5 Stunden Polymerisation konnte das Gel für die Elektrophorese benutzt werden. Hierzu wurden 5-bis maximal 40ul-Proben mit einer automatischen Pipette in die Taschen getragen und für die angegebenen Zeiten bei 50V konstant elektrophoresiert.
Falls erforderlich wurden die Gele in einer 0,1% Amidoschwarzlösung für 15 Minuten gefärbt und in dem gleichen Lösungsmittelgemisch ohne Farbstoff entfärbt.

2.2.17. Autoradiographie und Fluorographie

A. Reagenzien:

Röntgenfilme: RP-Royal"X-Omat" der Firma Kodak
Diphenyloxazol: 20% (w/w) in Dimethylsulfoxyd

B. Ausführung:

Die ^{32}P-markierten und auf Plattengelen aufgetrennten Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Gele auf einer Vorrichtung der Firma Desaga, Heidelberg, getrocknet, in dem sie auf ein Stück Whatman 3MM Filterpapier gesaugt wurden, das den getrockneten Gelen später als Unterlage diente. Mit den getrockneten Gelen wurde bei $-80^{o}C$ ein Röntgenfilm für die jeweils angegebenen Zeiten belichtet. Die Entwicklung der Filme wurde entsprechend den Herstellerdaten durchgeführt.
Für die Fluorographie, mit deren Hilfe die schwächeren Strahler wie ^{3}H und ^{14}C, sichtbar gemacht wurden, mußte vor dem Trocknen der Gele Diphenyloxazol in die Gelmatrix eingebracht werden. Hierzu wurden den Gelen nach einer von Laskey und Mills (1975) beschriebenen Methode durch zweimaliges Inkubieren für 30 Minuten in je 600ml Dimethylsulfoxyd das Wasser entzogen. Danach wurden sie 3 Stunden lang gegen 100ml Diphenyloxazollösung äquilibriert und anschließend gegen 600ml Wasser. So behandelt, konnten die Gele getrocknet und mit Röntgenfilmen in Kontakt gebracht werden.

III Ergebnisse

3.1. Verhalten von Histon-mRNA in synchronisierten HeLa-Zellen unter Bedingungen der Inhibition der Initiation der Proteinsynthese

3.1.1. Inhibierung der Histonsynthese und Stabilität der zytoplasmatischen Histon-mRNA unter hypertonen Kulturbedingungen

Untersuchungen von Gallwitz (1975) haben gezeigt, daß die Blockierung der DNA-Replikation mit Hydroxyharnstoff zu einer sehr schnellen Inaktivierung biologisch aktiver Histon-mRNA führt. Die selektive Degradation von Histon-mRNA unter diesen Bedingungen wird durch Cycloheximid jedoch verhindert. Dieses Ergebnis veranlaßte zu der Annahme, daß unter der Bedingung der DNA-Replikationsblockierung ein Schritt in der Initiation der Histon-mRNA-Translation inhibiert ist, was den schnellen Abbau dieser mRNAs zur Folge hat. Da Cycloheximid die Elongation der Proteinsynthese hemmt und zu einem "Einfrieren" der Polyribosomen führt, wurde das Schicksal der Histon-mRNA im Zytoplasma unter Bedingungen untersucht, die zur selektiven Hemmung der Initiation der Proteinsynthese führen.

Die Proteinsynthese in Gewebekulturen wird sofort und reversibel blockiert, wenn die Osmolarität des Wachstumsmediums erhöht wird. Von Saborio et al (1974) wurde gezeigt, daß unter solchen Bedingungen die Initiation der Proteinsynthese gehemmt wird, während die Elongation nicht betroffen ist. Für die hier beschriebenen Experimente wurden HeLa-Zellen benutzt, die in "Eagle's minimum essentiell Medium" mit 110mM NaCl wuchsen und durch Doppelblock mit Thymidin synchronisiert waren. Es wurde gefunden, daß die NaCl-Konzentration um 150mM erhöht werden mußte, um in Zellen in der Mitte der S-Phase (3-4 Stunden nach Reversierung des zweiten Thymidin-Blocks) die Proteinsynthese effizient zu blockieren.

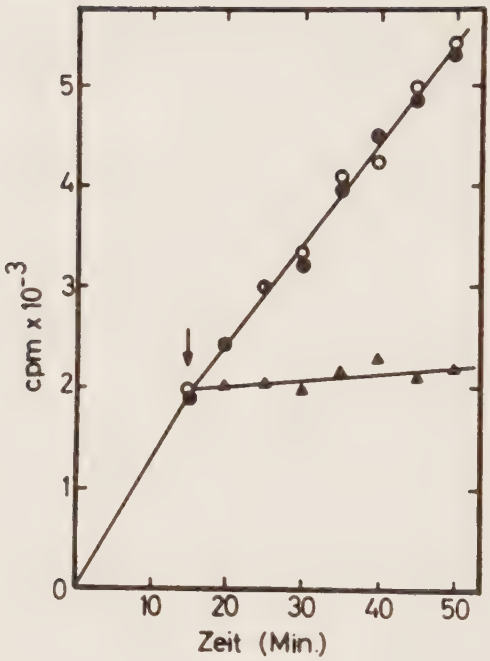

Abbildung 1:

Proteinsynthese in S-Phase-Zellen unter hypertonen Wachstumsbedingungen. Drei je 20ml-Kulturen synchronisierter Zellen, 3 Stunden in S-Phase, wurden mit 100µCi ^{3}H-Lysin für 15 Minuten markiert. Während für die weiteren Markierungszeiten eine Kultur als Kontrolle (o——o) dient, wurde die zweite mit 4mM Hydroxyharnstoff (•——•) und die dritte mit 150mM NaCl (△——△) behandelt. Der Lysineinbau wurde alle 5 Minuten in 2ml Anteilen der Zellsuspensionen bestimmt.

Abbildung 1 zeigt, daß zwar bereits 5 Minuten nach NaCl-Behandlung der Einbau von ^{3}H-Lysin in gesamtzelluläres Protein um mehr als 90% inhibiert war, aber die Proteinsynthese selbst nach 30 Minuten nicht völlig blockiert werden konnte. Die RNA-Synthese wurde nicht, die DNA-Synthese zu etwa 20% nach 30 Minuten dauernder hypertoner Behandlung der Zellen gehemmt (Abbildung 2 bzw. 3).

Während man in logarithmisch wachsenden HeLa-Zellen die Proteinsynthese bereits durch Erhöhung der NaCl-Konzentration um 100mM blockieren kann (Saborio et al, 1974), braucht man in S-Phase Zellen hierzu 150mM NaCl. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Initiation einiger bevorzugt während der S-Phase translatierter mRNAs eine höhere Resistenz gegenüber hypertonen Bedingungen zeigt als die anderer zelluärer mRNAs. Es wurden deshalb Polyribosomen aus unbehandelten S-Phase Zellen, Hydroxyharnstoff-geblockten und NaCl-behandelten Zellen isoliert und die wachsenden Peptidketten, wie unter Methoden beschrieben, in vitro komplettiert. Die erhaltenen ^{3}H-Lysin markierten Polypeptide wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen getrennt und durch Fluorographie dargestellt. Wie aus der Abbildung 4 zu sehen ist, zeigt sich nach Hydroxyharnstoff-Behandlung von 30 Minuten die bekannte spezifische Inhibierung der Histonsynthese (Spur 3). Andererseits sind die Proteine, die nach einem hypertonen Block für 30 Minuten synthetisiert werden, hauptsächlich Histone. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Histon-mRNAs eine höhere Bindungsaffinität zu Ribosomen haben als andere zelluläre mRNAs. Es sei aber angemerkt, daß unter hypertonem Schock die Histonsynthese stark gehemmt ist und nicht mehr als maximal 10-20% der totalen zytoplasmatischen Histon-mRNA an Polyribosomen gebunden sind.

Um den Einfluß des hypertonen Translationsblockes auf die Stabilität der zytoplasmatischen Histon-mRNA zu untersuchen, wurde die Menge translatierbarer zytoplasmatischer Histon-mRNA nach unterschiedlich langer hypertoner Behandlung von HeLa-Zellen in S-Phase untersucht.

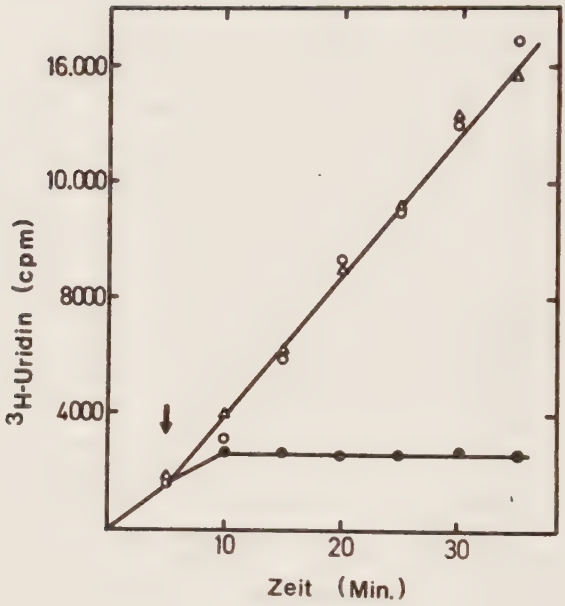

Abbildung 2:

RNA-Synthese in S-Phase-Zellen unter hypertonen Wachstumsbedingungen. Drei mal 20ml Kulturen synchronisierter Zellen, 3 Stunden in S-Phase, wurden mit ^{3}H-Uridin für 5 Minuten markiert. Während für die weiteren Markierungszeiten eine Kultur als Kontrolle (o——o) diente, wurde die zweite mit 150mM NaCl (Δ——Δ) und die dritte mit 5µg/ml Actinomycin D (●——●) behandelt. Der Uridineinbau wurde alle 5 Minuten in 2ml Aliquots der Zellsuspension bestimmt.

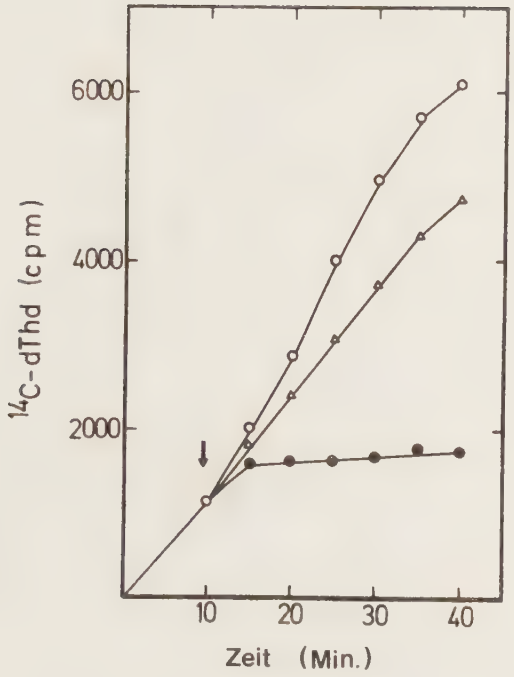

Abbildung 3:

DNA-Synthese in S-Phase-Zellen unter hypertonen Wachstumsbedingungen. Drei 20ml-Kulturen synchronisierter Zellen, 3 Stunden in S-Phase, wurden mit ^{14}C-Thymidin für 10 Minuten markiert. Während für die weiteren Markierungszeiten eine Kultur als Kontrolle (o——o) diente wurde die zweite mit 150mM NaCl (△——△) und die dritte mit 4mM Hydroxyharnstoff (●——●) behandelt. Der Thymidineinbau wurde alle 5 Minuten in 2ml Aliquots der Zellsuspension bestimmt.

Abbildung 4:

Fluorogramm der an isolierten HeLa-Zell-Polyribosomen in vitro synthetisierten Proteine. Wachsende Polypeptidketten wurden unter Einbau von ^{3}H-Lysin komplettiert. Die Proteine des gesamten In-vitro-Ansatzes wurden auf 15%-SDS-Polyacrylamid-Plattengelen aufgetrennt und die radioaktiven Banden durch Fluorographie sichtbar gemacht. Spuren 1 und 5: ^{14}C-Lysin-markierte HeLa-Markerhistone, Spur 2: In-vitro-Ansatz unbehandelter S-Phase-Zellen, Spur 3: In-vitro-Ansatz aus Hydroxyharnstoff blockierten S-Phasen-Zellen, Spur 4: In-vitro-Ansatz aus mit 150mM NaCl für 30 Minuten behandelten S-Phase-Zellen

Die Titration der Menge biologisch aktiver Histon-mRNA im Zytoplasma wurde mit einer von Breindl und Gallwitz (1973) ausgearbeiteten Methode durchgeführt. Dabei wird totale zytoplasmatische oder polyribosomale 5-15S RNA in einem Retikulozytenlysat translatiert, die säurelöslichen (0,25N HCl) Proteine an CM-Zellulose chromatographiert und aus der Relation von Radioaktivität in Globin und Histonen die Aktivität von Histon-mRNA kalkuliert (Gallwitz, 1975; Gallwitz, Bos, Stahl, 1978).

In der vorliegenden Arbeit wurde totale RNA aus den 16 000 x g-Überstand behandelter und unbehandelter Zellen durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und auf 15-30% Sucrosegradienten fraktioniert. RNA mit einer Sedimentationskonstante zwischen 5S und 15S wurde gesammelt und an Poly (U)-Sepharose chromatographiert. Die Translationsprodukte der Poly(A)-freien RNA aus Zellen in S-Phase sind in verschiedenen In-vitro-Systemen nahezu ausschließlich die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Abbildung 5).

Die Menge der Histon mRNA aus den verschieden behandelten Zellen wurde durch Translation im Retikulozytenlysat aus Kaninchen bestimmt. Die Ergebnisse (Abbildung 6) bestätigen, daß die Konzentration translatierbarer Histon-mRNA im Zytoplasma Hydroxyharnstoff-blockierter Zellen mit einer Halbwertzeit von 10-13 Minuten exponentiell abnimmt. Andererseits bewirkt die Inhibierung der zellulären Proteinsynthese durch Unterbrechung der Initiation mit NaCl nur einen leichten Rückgang (maximal um 20%) der Konzentration translatierbarer Histon-mRNA im Zytoplasma. Die Hemmung der Initiation der Proteinsynthese führt also nicht zu einem selektiven Abbau der Histon-mRNA.

3.1.2. Lokalisation der zytoplasmatischen Histon-mRNA

Frühere Experimente von Breindl und Gallwitz (1974) haben gezeigt, daß sich in synchronisierten HeLa-Zellen in S-Phase nur sehr geringe Mengen biologisch aktiver Histon-mRNA im partikelfreien Überstand finden. Da unter hypertonen

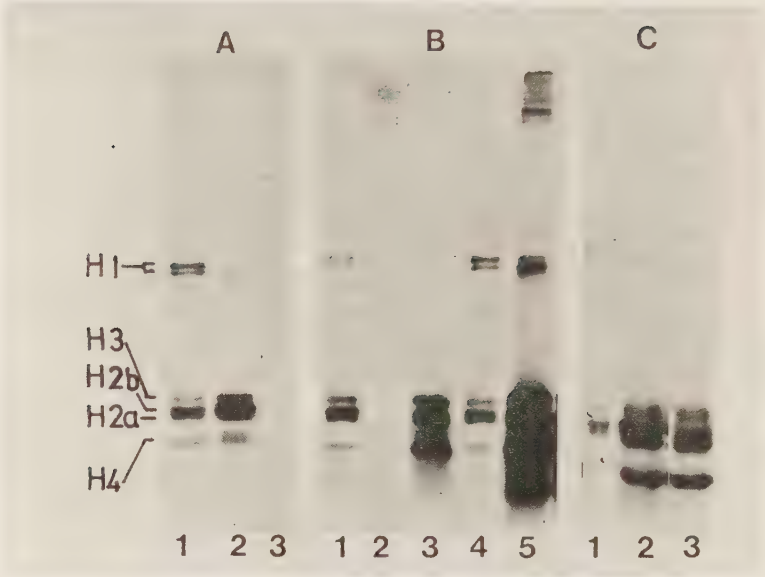

Abbildung 5:

Fluorogramm SDS-gelelektrophoretisch getrennter zellfreier Produkte, die unter der Direktion von 5S-15S-poly(A)-freier RNA (Histon-mRNA) aus HeLa-S-Phase-Zellen gebildet wurden.
A. in einem Retikulozytenlysat (Spur 1: ^{14}C-Markerhistone, Spur 2: Translationsprodukte in Abhängigkeit von Histon-mRNA nach CM-Zellulosechromatographie (CM-2 Fraktion), Spur 3: Translationsprodukte ohne exogene mRNA ebenfalls nach CM-Zellulosechromatographie (siehe Methoden))
B. in einem vorinkubierten zellfreien System aus HeLa-Zellen (Spur 1 und 4: Markerhistone, Spur 2: Translationsprodukte ohne exogene mRNA, Spur 3 und 5: Translationsprodukte in Abhängigkeit von Histon-mRNA)
C. in einem Weizenkeimlingssystem (Spur 1: Markerhistone, Spur 2 und 3: Translationsprodukte in Abhängigkeit von Histon-mRNA) Um die Synthese von Histon H1 zu zeigen wurde der Film in den Spuren 5(B) und 2(C) überbelichtet.

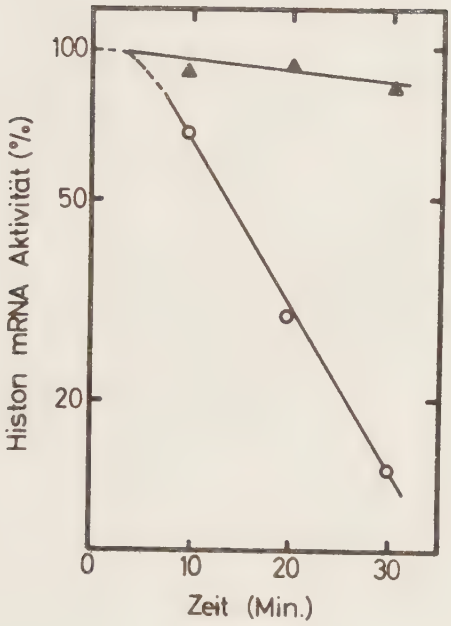

Abbildung 6:

Zeitkinetik der Histon-mRNA-Inaktivierung. Es wurden drei je 1 500ml-Kulturen synchronisierter S-Phase-Zellen benutzt. Zu einer Kultur wurde Hydroxyharnstoff (4mM) (o——o) gegeben, eine zweite wurde mit 150mM NaCl (▲——▲) behandelt und die dritte Kultur diente als Kontrolle (100% Aktivität). In Zeitabständen von je 10 Minuten nach Hinzufügen der Chemikalien wurden jeweils 500ml der Zellsuspensionen über zerstoßenes Waschpuffereis (siehe 2.2.2.) gegossen und die Zellenwurden geerntet, gewaschen und lysiert. Von den 16 000 x g-zytoplasmatischen Überständen wurde totale RNA isoliert, fraktioniert und der Histon-mRNA-Gehalt durch Translation in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat quantiziert (siehe Methoden).

Wachstumsbedingungen die Polyribosomen zerfallen, erschien es interessant zu untersuchen, ob Histon-mRNAs unter diesen Bedingungen im Zytoplasma frei, protein- oder partikelgebunden vorliegen. Unser besonderes Interesse galt dabei der Frage, ob die Histon-mRNAs sich wie andere zelluläre Messenger verhalten und nach Hemmung der Initiation der Proteinsynthese, wie z.B. nach Hitzeschock (Perry und Kelly, 1973), als mRNA-Proteinkomplex (mRNP) im Zytoplasma überleben.

In diesem Experiment wurde eine Kultur von HeLa-Zellen synchronisiert und drei Stunden nach dem Eintritt der Zellen in die S-Phase geteilt. Eine der Kulturen wurde durch Zugabe von NaCl (150mM) hyperton gemacht, während die andere unbehandelt blieb. Nach weiteren 30 Minuten wurde aus den Zellen beider Kulturen zytoplasmatischer 16 000 x g-Überstand präpariert und auf 15-40% Sucrose-Gradienten fraktioniert. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 7 dargestellt. Es ist zu sehen, daß unter den beschriebenen hypertonen Bedingungen die Polyribosomen nahezu vollständig desintegrieren. Polyribosomen, Monosomen und ribosomale Untereinheiten nebst Material kleiner als ribosomale Untereinheiten wurden gesammelt. Aus den Äthanolpräzipitaten dieser Fraktionen wurde Histon-mRNA isoliert und quantitiert. Die Ergebnisse zweier Experimente sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

In unbehandelten S-Phase Zellen waren mehr als 80% der Histon-mRNA, bezogen auf die vom gesamten Gradienten zurückgewonnene Menge, an Polyribosomen gebunden (Fraktion a). Nur 3-6% der Histon-mRNA war in der Fraktion mit einer Sedimentationskonstante kleiner als 40S (Fraktion c) zu finden, wobei man diese mRNA-Menge als einen oberen Grenzwert betrachten sollte, da diese Fraktion mit geringen Mengen von Ribosomen und deren Untereinheiten verunreinigt sein dürfte. In der Fraktion b, die die Monosomen und die ribosomalen Untereinheiten enthält, waren 10-15% der totalen Histon-mRNA nachweisbar. Im Gegensatz dazu fanden sich im Zytoplasma NaCl-behandelter Zellen 40-50% der totalen Histon-mRNA in der Fraktion leichter als 40S. In einem

Kontrollexperiment wurde die von den Sucrose-Gradienten zurückgewonnene Histon-mRNA-Menge mit der in dem Auftrag nachweisbaren verglichen. Es zeigte sich, daß von den Gradienten mit zytoplasmatischem Extrakt aus unbehandelten Zellen und NaCl-behandelten Zellen 101% bzw. 92% der totalen Histon-mRNA, bezogen auf die Auftragsmenge, zurückerhalten wurde. Weitere Auftrennung des zytoplasmatischen Überstandes aus NaCl-behandelten Zellen durch Sucrose-Gradientenzentrifugation ergab, daß die Histon-mRNA in Form von mRNA-Protein-Partikeln im Bereich von 15-30S sedimentiert (Abbildung 8). Wie aus der Darstellung zu sehen ist, waren 42% der totalen von Gradienten zurückgewonnenen Histon-mRNA in den Fraktionen 2 und 3 zu finden. In der Gradientenfraktion 1 und dem Pellet, die zusammen die Polyribosomen, die Monosomen und die ribosomalen Untereinheiten enthalten, waren etwa 55% der totalen Histon-mRNA nachzuweisen. Die Werte aus der Abbildung 8 stimmen im übrigen gut mit denen aus der Tabelle 1 überein. Fast überhaupt keine Histon-mRNA war in der Fraktion leichter als 15S, also als freie mRNA (8-10S), nachzuweisen.

Tabelle 1: Zytoplasmatische Lokalisation translatierbarer Histon-mRNA

Zytoplasmatische 16 000xg-Überstände von NaCl-behandelten oder unbehandelten S-Phase Zellen wurden in 15-40% Sucrosegradienten fraktioniert. Die in Abbildung 7 angezeigten Fraktionen wurden gesammelt. Hieraus wurde Histon-mRNA isoliert und durch Translation in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat quantitiert (siehe Methoden).

Sucrose-Gradienten-fraktion	Menge translatierbarer Histon-mRNA in S-Phase Zellen (% der Gesamtmenge)	
	unbehandelt	NaCl-behandelt
Polyribosomen	81,1 (81,8)	10,9 (20,2)
Monosomen	12,1 (14,8)	40,1 (40,8)
<40S	6,8 (3,4)	49,0 (39,0)

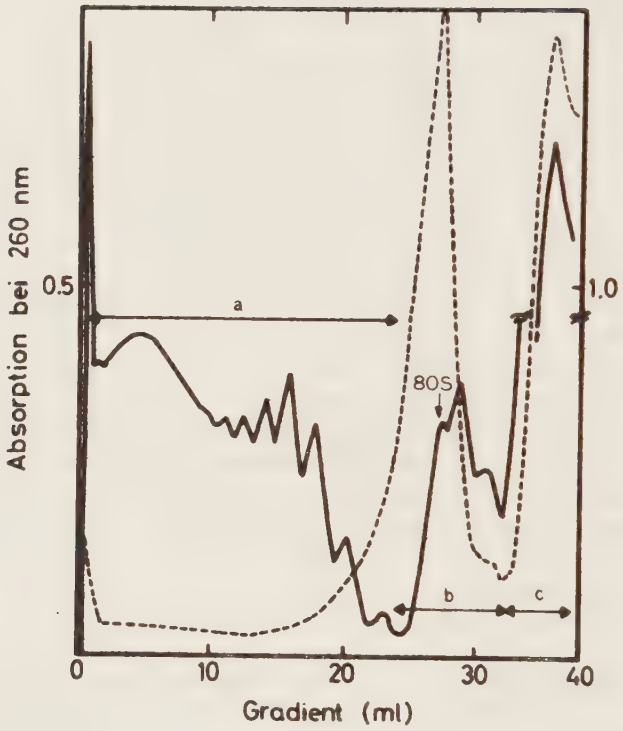

Abbildung 7:

Sucrosegradientenzentrifugation zytoplasmatischer Extrakte. Synchronisierte HeLa-Zellen ($4x10^5$ Zellen/ml), 3 Stunden in S-Phase, wurden für 30 Minuten mit 150mM NaCl behandelt (----). Die Zellen der Salz-behandelten und einer unbehandelten Kultur (——) wurden abzentrifugiert, lysiert und die zytoplasmatischen 16 000xg Überstände durch 15-40%ige Sucrosegradienten zentrifugiert. Die durch die Pfeile angezeigten Fraktionen wurden zur Isolation von Histon-mRNA gesammelt. Die beiden Absorptionsprofile wurden übereinander gelegt.

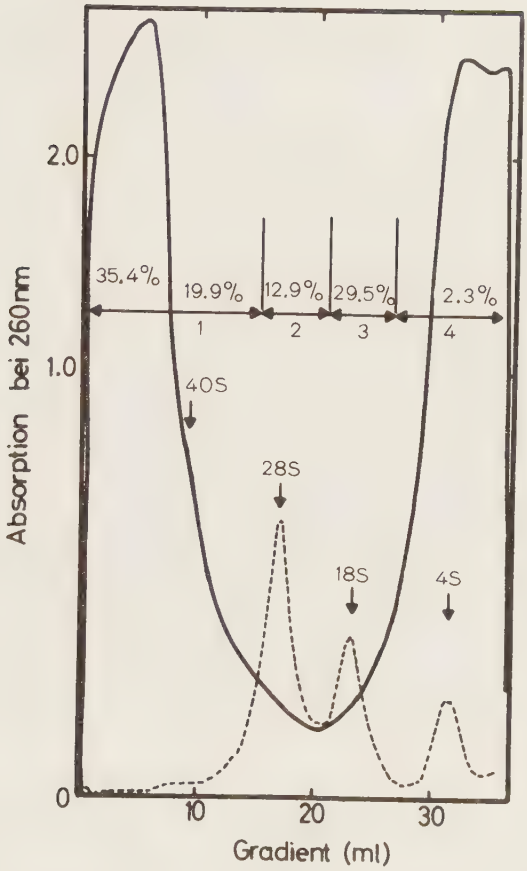

Abbildung 8: Sucrosegradientenzentrifugation eines zytoplasmatischen Extraktes aus NaCl-behandelten Zellen. Der 16 000xg Überstand von S-Phase-Zellen, die wie in Abb.7 beschrieben, behandelt waren, wurden für 16 Stunden bei 25 000 Umdrehungen/Minute in einem Beckman-SW27-Rotor durch einen 15-40%igen Sucrosegradienten zentrifugiert (——). Aus den gesammelten Fraktionen (durch Pfeile angezeigt) und aus dem Pellet wurde Histon-mRNA isoliert und durch Translation quantitiert. Die Werte in der Abbildung geben den aus jeder Fraktion isolierten prozentualen Anteil der gesamten Histon-mRNA-Menge an. Auf einem parallelen Gradienten wurde ribosomale HeLa-RNA als Marker aufgetrennt (----). Die beiden Absorptionsprofile wurden übereinander gelegt.

Die Translationsprodukte der Histon-mRNAs aus den verschiedenen Partikelfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 9 gezeigt, sind die individuellen Histon-mRNAs offenbar in gleichen Proportionen sowohl in Polyribosomen, Monosomen und den mRNPs vorhanden.

Die Autoradiographie des in der Abbildung 9 gezeigten Plattengels zeigt außerdem, daß die Translationsprodukte der Poly(A)-freien 5-15S RNA aus den Monosomen NaCl-behandelter Zellen Polypeptide (a, b, c) enthalten, die nicht das gleiche elektrophoretische Verhalten wie eines der fünf Histone haben. Diese markierten Polypeptide werden im übrigen auch in Translationsprodukten von 5-15S poly(A)$^{(-)}$-RNA von Monosomen Mengovirus-infizierter Zellen gefunden (Gallwitz, Traub und Traub, 1977). Außerdem enthalten die Translationsprodukte nicht über Poly(U)-Sepharose gereinigter polysomaler 5-15S RNA aus HeLa-Zellen in S-Phase diese Proteine. Dieser Befund deutet die interessante Möglichkeit an, daß eukaryontische mRNAs vom 3'-Hydroxylende her degradiert werden, wobei bei Poly(A)-haltigen Messengers zunächst das Poly(A)-Segment entfernt wird und die mRNAs dann natürlich nicht mehr an Poly(U)-Sepharose gebunden werden.

Die unter hypertonen Wachstumsbedingungen beobachtete Stabilität der zytoplasmatischen Histon-mRNA könnte allerdings dadurch vorgetäuscht sein, daß angekurbelte Neusynthese von Histon-mRNA den möglicherweise sehr schnellen Abbau der mRNA ausgleicht. Da in der Tat Histon-mRNAs sehr rasch vom Kern ins Zytoplasma transportiert werden (Schochetman und Perry, 1972) und ein hypothetischer Transportweg Kern $\longrightarrow$ mRNP$_{\text{Zytoplasma}}$ $\longrightarrow$ Polyribosomen$_{\text{Zytoplasma}}$ bestehen könnte, ist eine solche Deutung der geschilderten Befunde a priori nicht auszuschließen. Um die Frage zu untersuchen, ob die Histon-mRNAs, die im Zytoplasma als RNP-Partikel gefunden wurden, neu synthetisiert oder beim Zerfall der Polyribosomen frei werden, wurden HeLa-Zellen gleichzeitig mit 150mM NaCl und Actinomycin D (5µg/ml) für 30 Minuten behandelt. Für diesen Versuch wurden synchronisierte Zellen 3-4 Stunden

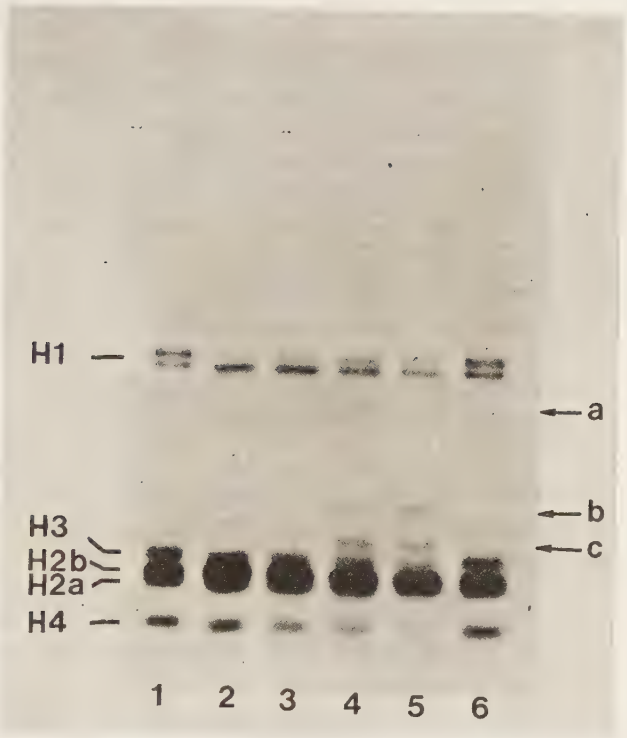

Abbildung 9:

Fluorogramm der Translationsprodukte aus Abb.8. Die Histon-mRNA aus den einzelnen Fraktionen von Abb.8 wurde in einem Retikulozytenlysat translatiert. Die in 0,25N HCl löslichen Proteine der Inkubationsansätze wurden an CM-Zellulose fraktioniert und die in-vitro synthetisierten Histone (^{3}H-markiert) wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. 25 000cpm wurden in jede Tasche aufgetragen. Von dem Gel wurde eine Fluorographie gemacht (60 Stunden, -80°C). Auftrag, Spuren 1 und 6: ^{14}C-Markerhistone; Spuren 2-5:-Translationsprodukte der mRNA von Gradientenfraktionen 3-1 bzw. vom Pellet. Die Pfeile geben die drei zusätzlichen Banden an, die nicht mit Histonen wandern.

nach Eintritt in die S-Phase gewählt, da sich in diesem Stadium die Menge der biologisch aktiven Histon-mRNA in der Zelle nicht merklich ändert. Obwohl Actinomycin D neben der Hemmung der RNA-Synthese auch auf unbekannte Weise in den Prozess der Proteinsynthese eingreifen kann (Goldstein und Penman, 1973), wurde die Droge hier als effektiver RNA-Syntheseblocker gewählt, da sie besonders auf die Synthese (G+C)-reicher RNA wirkt, wo zu Histon-mRNA gezählt werden muß (Grunstein und Schedl, 1976). Die RNA-Synthese, gemessen an dem Einbau von ^{3}H-Uridin, wurde nach Gabe von Actinomycin D innerhalb von fünf Minuten sowohl in NaCl-behandelten als auch in unbehandelten S-Phase Zellen total blockiert. Andererseits wurde die RNA-Synthese durch die NaCl-Behandlung allein überhaupt nicht betroffen (siehe Abbildung 2).

Zur Lokalisation der Histon-mRNA wurden die zytoplasmatischen 16 000xg-Überstände von Actinomycin D-behandelten, in normalem und hypertonem Medium wachsenden Zellen auf Sucrose-Gradienten fraktioniert und die Histon-mRNA-Konzentrationen dieser Fraktionen quantitiert. Es wurde gefunden, daß trotz Hemmung der RNA-Synthese in NaCl-behandelten Zellen 39,2% der totalen Histon-mRNA in der Fraktion, die langsamer als 40S sedimentierte, nachzuweisen waren (Tabelle 2).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, daß unter Bedingungen der Hemmung der Initiation der Proteinsynthese ein signifikanter Anteil der in Form von mRNP-Partikeln überlebenden Histon-mRNAs zu Beginn des hypertonen Schocks an Polyribosomen gebunden war und nicht während der hypertonen Wachstumsbedingungen neu synthetisiert wurde. Die Inhibierung der Initiation der Proteinsynthese ist damit nicht der Grund für die exponentiell verlaufende rasche Inaktivierung dieser mRNAs.

Tabelle 2: Zytoplasmatische Lokalisation der Histon-mRNA nach Behandlung von S-Phase Zellen mit Actinomycin D. Zwei 1000ml Kulturen von S-Phase Zellen wurden für 30 Minuten entweder mit 150mM NaCl oder mit Actinomycin D (5µg/ml) und 150mM NaCl behandelt. Die zytoplasmatischen Extrakte (16 000xg) wurden auf 15-40% Sucrose-Gradienten aufgetrennt, und Histon-mRNA wurde aus den entsprechenden Fraktionen (siehe Abbildung 7) isoliert und quantitiert.

Sucrose-Gradienten-fraktionen	Menge biologisch aktiver Histon-mRNA in NaCl-behandelten S-Phase Zellen (% der Gesamtmenge)	
	- Actinomycin	+ Actinomycin
Polyribosomen	18,1	21,6
Monosomen	35,3	39,2
< 40S	46,4	39,2

3.1.3. Proteinsyntheseabhängigkeit der Degradation der Histon-mRNA

Wie schon erwähnt, kann die Inaktivierung der Histon-mRNA nach durch Hydroxyharnstoff verursachter Blockierung der DNA-Synthese durch den Translationsinhibitor Cycloheximid verhindert werden (Gallwitz, 1975). Da die oben beschriebenen Experimente zeigen, daß Histon-mRNA auch im Zytoplasma überleben kann ohne an Ribosomen gebunden zu sein, versuchten wir zu klären, ob der Abbau der Histon-mRNA ein proteinsyntheseabhängiger Prozess ist.

Für diese Untersuchungen wurden HeLa-Zellen synchronisiert, und in Mitte der S-Phase wurde die DNA-Replikation mit Hydroxyharnstoff unterbrochen. In drei Parallelkulturen wurde in Abständen von 10, 20 und 30 Minuten nach Blockierung der DNA-Synthese die Proteinsynthese durch NaCl ebenfalls inhibiert. 30 Minuten danach wurde die zytoplasmatische Histon-mRNA isoliert und durch Translation quantitiert. In

einem Kontrollexperiment war vorher durch Messen der Inkorporation von ^{14}C-Thymidin sichergestellt worden, daß Hydroxyharnstoff unabhängig davon, ob die Zellen in isotonem oder hypertonem Medium wachsen, gleichermaßen effektiv die DNA-Synthese blockiert. Wie aus Abbildung 10 zu sehen ist, nimmt die Histon-mRNA-Konzentration nur sehr leicht ab, wenn gleichzeitig mit der Gabe von Hydroxyharnstoff die NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium der Zellen um 150mM erhöht wurde. Die Behandlung mit Hydroxyharnstoff allein jedoch führte zu der bekannten schnellen Degradation der mRNA. Wenn NaCl 10 bzw. 20 Minuten nach der Blockierung der DNA-Synthese zum Wachstumsmedium gegeben wurde, wurde die Degradation der Histon-mRNA ebenfalls gehemmt. Die zytoplasmatische Kontrolle des raschen und selektiven Histon-mRNA-Abbaues nach Unterbrechung der DNA-Replikation geschieht nach diesen Ergebnissen offensichtlich über den Vorgang der Proteinsynthese.

3.2. Translationseffizienz von Histon- und Globin-mRNA in zellfreien Proteinsynthesesystemen unter dem Einfluß zytoplasmatischer Extrakte aus HeLa-Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus

Die oben beschriebenen experimentellen Befunde zeigen, daß der selektive Abbau von Histon-mRNA im Zytoplasma nach Unterbrechung der DNA-Replikation ein proteinsyntheseabhängiger Prozess ist. Es ist anzunehmen, daß eine oder mehrere zytoplasmatische Komponente(n) entweder synthetisiert oder aktiviert werden und an der Inaktivierung dieser mRNAs beteiligt sind.

Im folgenden wurde versucht zu zeigen, ob in kernfreien Extrakten von Hydroxyharnstoff blockierten Zellen Faktoren nachweisbar sind, die die Translationseffizienz von Histon-mRNA in zellfreien Proteinsynthesesystemen spezifisch hemmen. Diese Untersuchungen wurden a) in einem Weizenkeimlingssystem (WG-S30-System) durchgeführt, das sich durch niedrige Backgroundsynthese von Protein auszeichnet und

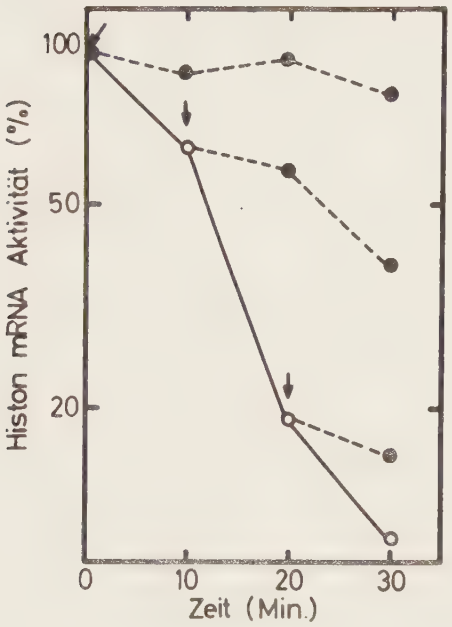

Abbildung 10:

Zeitkinetik der Histon-mRNA-Inaktivierung. Fünf synchronisierte HeLa-Zellkulturen, 3 Stunden in S-Phase, wurden benutzt ($4x10^5$ Zellen). Während eine Kultur als Kontrolle diente, wurde zu den anderen 4 Kulturen zum Zeitpunkt 0 Minuten Hydroxyharnstoff (4mM) gegeben. Zu dreien dieser Kulturen wurde zusätzlich NaCl (150mM) zu den Zeitpunkten 0, 10 und 20 Minuten (siehe Pfeile) zugefügt. Alle 10 Minuten nach Hinzufügen der beiden Chemikalien wurden 400ml der Zellsuspensionen auf zerstoßenes Waschpuffereis gegossen und die Histon-mRNA der Zellen wurde isoliert und durch Translation quantitiert (siehe Methoden). (o—o): Histon-mRNA-Inaktivierung in Hydroxyharnstoff-blockierten Zellen. (●--●): Histon-mRNA-Inaktivierung in Hydroxyharnstoff-blockierter Zellen nach NaCl-Zugabe.

b) in einem Proteinsynthesesystem aus HeLa-Zellen, das unter äußerst schonenden Bedingungen präpariert wurde, um die Inaktivierung von eventuell labilen Faktoren zu vermeiden. Die Translationseffizienz von Histon-mRNA aus HeLa-Zellen wurde mit der von Kaninchen-Globin-mRNA, die eine ähnliche Molekülgröße hat, verglichen.

3.2.1. Translation von Histon- und Globin-mRNA im Weizenkeimlingsystem

Für einen sinnvollen Vergleich der mRNA-Aktivitäten in einem In-vitro-System ist es erforderlich, die Proteinsynthese im zeitlich linearen Bereich des Translationsprozesses zu messen und die mRNA in Mengen einzusetzen, die das System noch nicht oder gerade sättigen. Daher wurden diese beiden Parameter bestimmt. Wie aus Abbildung 11 zu ersehen ist, besitzt das WG-S30-System für mindestens 10 Minuten bei 30°C eine nahezu lineare Einbaukinetik, wobei es für diesen Zeitpunkt zu einer etwa 20-fach höheren Inkorporation von ^{3}H-Lysin und ^{3}H-Leucin durch zugegebene Globin-mRNA gegenüber der endogenen Synthese kommt.

In Abbildung 12 ist die Abhängigkeit der Proteinsyntheserate von steigenden Konzentrationen der mRNAs dargestellt. Eine Sättigung des Systems mit der Globin-mRNA-Präparation wird bei 35µg/ml und mit der Histon-mRNA-Präparation bei 95µg/ml erreicht. Die hier benutzte Globin-mRNA war nur hinsichtlich ihres Translationsproduktes als rein zu bezeichnen, der chemische Reinheitsgrad betrug etwa 20%. Um bei Vergleichen mit der noch unreineren Histon-mRNA Artefakte durch unterschiedliche RNA-Belastung des In-vitro-Systems bei der Translation zu vermeiden, wurde absichtlich auf eine weitere Reinigung der Globin-mRNA verzichtet.

Die Translationsprodukte mit gerade sättigenden Konzentrationen der mRNAs wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Abbildung 13 zeigt ein Fluorogramm dieses Plattengels. Es ist zu sehen, daß unter der Direktion der Globin- bzw. Histon-mRNA-Präparation nur die entsprechenden Proteine

synthetisiert wurden. Die zwei Banden von Histon H1 sind schwächer zu sehen als die der übrigen Histone, was darauf hindeutet, daß die hier benutzte aus gesamten zytoplasmatischen Überstand isolierte RNA, wahrscheinlich nur geringe Mengen dieser mRNA-Spezies enthält.

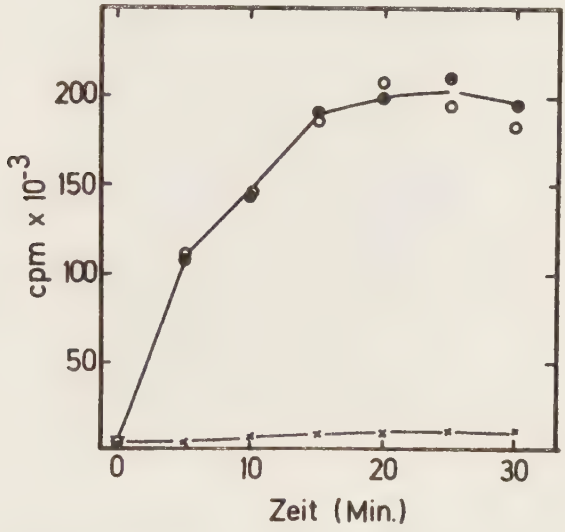

Abbildung 11:

Proteinsynthese im WG-S30-System in Abhängigkeit von der Zeit. 50µl der Translationsansätze wurden unter den in Methoden beschriebenen Bedingungen bei 30°C mit und ohne Globin-mRNA inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 5µl in 20%iger TCA auf Whatman 3MM-Papier gefällt und der Einbau von ^{3}H-Lysin und ^{3}H-Leucin in Polypeptide bestimmt.

x——x: endogene Synthese

●——o: Synthese mit Globin-mRNA (35µg/ml)

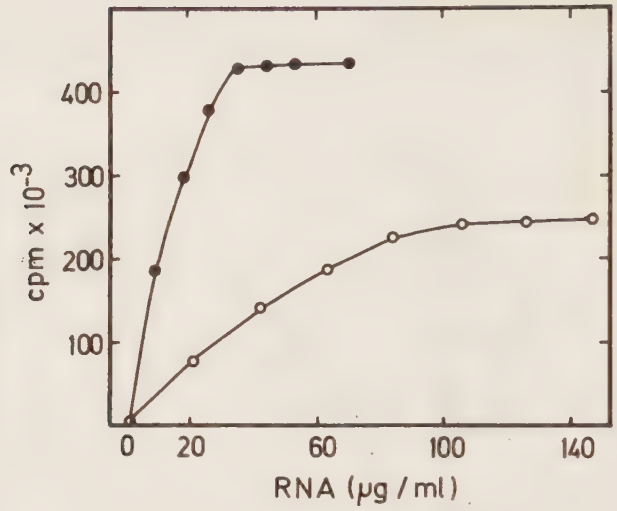

Abbildung 12:

Titration von Globin- und Histon-mRNA im WG-S30-System. 50µl-Inkubationsgemische wurden mit steigenden Mengen von mRNA versetzt und unter Proteinsynthesebedingungen (siehe Methoden) für 10 Minuten inkubiert. Dann wurden je 10µl auf Whatman 3MM-Papier gefällt und der Einbau von ^{3}H-Lysin, ^{3}H-Leucin und ^{3}H-Alanin bestimmt. Die Werte für die endogene Synthese wurden abgezogen. Die Abbildung gibt die Durchschnittswerte aus zwei Experimenten wieder.

o——o: Histon-mRNA-abhängige Synthese

•——•: Globin-mRNA-abhängige Synthese

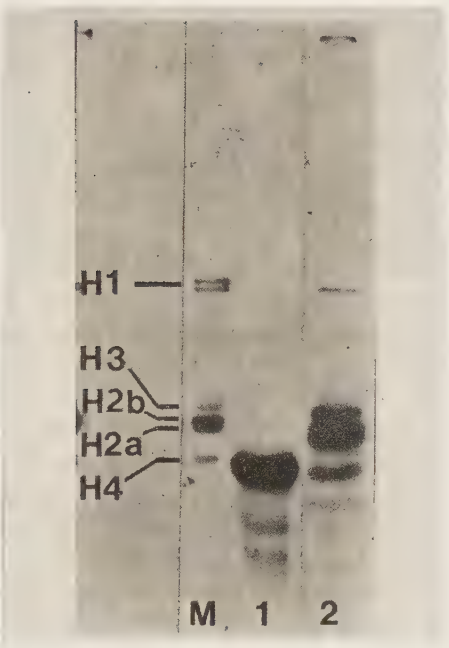

Abbildung 13:

Fluorogramm der In-vitro-Translationsprodukte.
7,5µl des Translationsgemisches mit Globin- bzw. Histon-mRNA wurden auf einem 15%igen Polyacrylamid-Plattengel für 12 Stunden bei 50V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde gefärbt, für die Fluorographie vorbereitet und 2 Tage mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht.
Spur M: ^{14}C-Markerhistone
Spur 1: Globin-mRNA-abhängige Synthese
Spur 2: Histon-mRNA-abhängige Synthese
Die Banden im niedermolekularen Bereich (kleiner als Histon H4) sind auf nichtkomplettierte Peptidketten zurückzuführen. Nicht markiertes Globin-Markerprotein wurde durch Anfärben mit Amidoschwarz sichtbar gemacht und zeigte identisches Laufverhalten mit der in Spur 1 stark geschwärzten Bande.

3.2.2. Beeinflussung der Translationseffizienz von Globin- und Histon-mRNA in-vitro durch zytoplasmatische Extrakte von HeLa-Zellen

Im folgenden wurde versucht, ob sich die postulierten für die Inaktivierung von Histon-mRNA verantwortlichen Faktoren durch Zugabe eines zytoplasmatischen Extraktes aus hydroxyharnstoffblockierten HeLa-Zellen zu einem heterologen In-vitro-Translationssystem durch spezifische Hemmung der Histonsynthese nachweisen lassen. Um über die Messung der Einbauraten radioaktiv markierter Aminosäuren in Polypeptide eine Änderung in der Translationsaktivität nur einer mRNA-Spezies erfassen zu können, wurden vorher aus dem zytoplasmatischen Extrakt alle Polyribosomen durch Zentrifugation entfernt.

Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen. Zwei jeweils $3x10^8$ HeLa-Zellen enthaltenden Kulturen wurde nach Synchronisation (Doppelblock mit Hydroxyharnstoff) ermöglicht in die S-Phase zu wachsen. Während die Kultur A als unbehandelte Kontrolle diente, wurde zur Kultur B drei Stunden nach Eintritt in die S-Phase Hydroxyharnstoff (Endkonzentration 4mM) gegeben. Nach weiteren 20 Minuten wurde aus den Zellen beider Kulturen, wie unter Methoden beschrieben, ein 20 000xg zytoplasmatischer Extrakt hergestellt, aus dem dann durch Zentrifugation für eine Stunde bei 55 000rpm ein sogenannter postpolysomaler Überstand gewonnen wurde, der bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert wurde. Die Adsorption beider Extrakte war gleich und betrug bei 260nm für Überstand A 34,6 Einheiten, für Überstand B 35,8 Einheiten und bei 280nm für Überstand A 22,8 Einheiten und für Überstand B 24,0 Einheiten.

Der Einfluß von jeweils 5µl und 10µl dieser zytoplasmatischen Extrakte auf die Translationsaktivität von Histon- und Globin-mRNA wurde in je 50µl des zellfreien WG-S30-Systems getestet. Die mRNAs wurden in gerade das System sättigenden Mengen eingesetzt. Die Durchschnittswerte von zwei Experimenten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Inhibierung der Translation von Histon- und Globin-mRNA im WG-S30-System durch postpolysomale Überstände aus HeLa-Zellen

Postpolysomaler Überstand aus:	Menge (A_{260} E/ml)	Inhibierung des Aminosäureeinbaus (%) mRNA		
		Histon	Globin	Histon+Globin
HU-behandelte Zellen	7	94,74	89,63	90,14
	3,5	89,51	79,30	78,49
S-Phase Zellen	7	94,31	91,34	88,14
	3,5	89,99	80,00	78,94

Die mRNA-Translation wurde mit und ohne den in der Tabelle angegebenen Mengen postpolysomaler Überstände verglichen. Die mRNA-Konzentration betrug 95µg/ml für Histon-mRNA und 35µg/ml für Globin-mRNA. Nach 10 Minuten dauernder Translation bei 30°C wurden 10µl eines jeden Ansatzes in 20%iger TCA auf Filterpapier gefällt und der Einbau von ^{3}H-Lysin und ^{3}H-Leucin in Polypeptide bestimmt. Bei der Berechnung dienten die entsprechenden Ansätze ohne postpolysomalen Überstände als Kontrolle. (HU= Hydroxyharnstoff)

Die Ergebnisse dieser und mehrere in gleicher Weise durchgeführten Experimente zeigten eine starke Abnahme der Polypeptidsyntheserate bei Zugabe der HeLa-Zellextrakte, die sowohl auf niedermolekulare Stoffe, insbesondere auf kalte Aminosäuren, sowie auf eine unspezifische Hemmung, z.B. durch ribosomale RNA und RNasen zurückzuführen sein dürfte. Eine spezifische Reduzierung der Translationsaktivitäten der Histon-mRNA durch den Extrakt aus blockierten HeLa-Zellen ist jedoch nicht zu erkennen. Auch wird die Translationseffizienz von Histon-mRNA gegenüber Globin-mRNA durch beide Extrakte nicht unterschiedlicher inhibiert. Abbildung 14 zeigt ein Fluorogramm der gelelektrophoretisch aufgetrennten ^{3}H-markierten Translationsprodukte dieses Versuches.

Hieraus ist zu erkennen, daß die Translation der mRNAs unter dem Einfluß der HeLa-Zellextrakte zu fertigen Polypeptiden führt und nur die den eingesetzten mRNAs entsprechenden Produkte gebildet werden.

In einem weiteren Experiment wurden die postpolysomalen Überstände durch eine Gelfiltration über Sephadex-G25 in eine nieder- und eine hochmolekulare Fraktion getrennt und jede Fraktion wie oben beschrieben auf den Einfluß der Translationseffizienz beider mRNAs geprüft. Auch hier konnte keine spezifische Beeinflussung der Histon-mRNA-Translation gemessen werden.

3.2.3. Translationseffizienz von Histon- und Globin-mRNA in zellfreien Proteinsynthesesystemen von HeLa-Zellen

Faktor(en), die zu einer spezifischen Degradation von Histon-mRNA führen, könnten in der Zelle ribosomal gebunden sein und würden dann im postpolysomalen Überstand nicht mehr zu finden sein. Um eine solche Möglichkeit auszuschliessen und die Bedingungen des In-vitro-Systems möglichst nahe zu In-vivo-Verhältnisse anzugleichen, wurde ein weiterer Versuch in einem homologen zellfreien Proteinsynthesesystem aus HeLa-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 4 Liter einer Kultur von HeLa-Zellen ($3{,}5 \times 10^5$ Zellen/ml) durch Doppelblock mit Hydroxyharnstoff synchronisiert. Drei Stunden nach Eintritt der Zellen in die S-Phase wurden die Kulturen geteilt und die Zellen einer Kultur (B) mit 4mM Hydroxyharnstoff für 25 Minuten behandelt. Danach wurde aus den Zellen beider Kulturen wie beschrieben ein 16 000xg Zellextrakt (S16-Extrakt) hergestellt. Aus dem Zellhomogenat wurden also lediglich Zelltrümmer, Zellkerne und Mitochondrien nicht aber Ribosomen entfernt. Dieser Extrakt enthält alle für die Proteinsynthese notwendigen Faktoren und polyribosomal gebundene mRNA. Um eine mögliche Inaktivierung eines labilen Translationsinhibitors oder dessen Verlust bei einer Gelfiltration infolge kleiner Molekülgrößen zu verhindern, wurde sowohl auf eine Vorinkubation der Extrakte

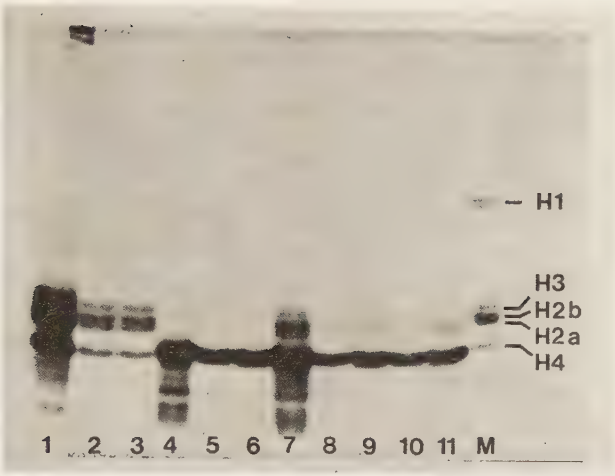

Abbildung 14:

Fluorogramm der In-vitro-Translationsprodukte von Histon- und Globin-mRNA unter dem Einfluß postpolysomaler Überstände aus HeLa-Zellen. 12µl der verschiedenen Translationsansätze (Tabelle 3) wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Plattengel aufgetrennt. Das Gel wurde für die Fluorographie vorbereitet und 2 Tage mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht. Spur 1-3: Histon-mRNA-abhängige Translationsprodukte ohne (1) bzw. mit postpolysomalen Überstand (3,5A_{260} Einheiten/ml) aus HeLa-Zellen in S-Phase (2) und geblockten Zustand (3) Spur 4-6: Globin-mRNA-abhängige Translationsprodukte; Bedingungen wie in Spur 1-3. Spur 7-11: Translationsprodukte in Abhängigkeit von Histon- und Globin-mRNA; ohne HeLa-Zellextrakte (7), mit 7 bzw. 3,5 A_{260} Einheiten/ml postpolysomalen Überstand aus S-Phase-Zellen (8,9) und mit 7 bzw. 3,5A_{260} Einheiten/ml postpolysomalen Überstand aus Hydroxyharnstoff-blockierten Zellen (10,11).
Spur M: ^{14}C-Markerhistone aus HeLa-Zellen
Die Banden im niedermolekularen Bereich (kleiner als Histon H4) sind auf nicht fertige Polypeptidketten, bedingt durch Degradation der mRNA vom 3'-Hydroxylende her während der Inkubation im WG-S30-System, zurückzuführen.

unter Proteinsynthesebedingungen als auch auf eine Gelfiltration verzichtet.

Es wurde dann gefunden, daß in einem solchen Extrakt unter Proteinsynthesbedingungen (HeLa-S16-System) der Aminosäureeinbau durch exogene mRNA stimuliert werden kann und für mindestens 15 Minuten linear verläuft (Abbildung 15).

Die Translationseffizienz von Histon-mRNA und Globin-mRNA wurde in beiden zellfreien Systemen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und in Abbildung 16 wiedergegeben.

Tabelle 4: Proteinsynthese in zellfreien HeLa-S16-Systemen

mRNA (µg/ml)	Einbau von ^{3}H-Aminosäuren (cpm)		Stimulierung (%)	
	System A	System B	System A	System B
Histon: ----	58 000	53 325	-----	-----
22,5	67 125	65 125	15,73	22,19
90,0	65 850	61 025	13,53	14,49
Globin: ----	56 525	53 925	-----	-----
8,8	68 625	68 000	21,64	26,16
35,2	64 650	62 125	14,40	15,25

Zellfreie Systeme aus S-Phase-Zellen (System A) und Hydroxyharnstoff-blockierten S-Phase-Zellen (System B) wurden ohne und mit Histon- bzw. Globin-mRNA für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Der Einbau von ^{3}H-Lysin und ^{3}H-Leucin in säurefällbares Material wurde von 10µl-Aliquots gemessen. Die Stimulierung der Proteinsynthese durch exogene mRNA ist in % der Kontrolle ausgedrückt.

Es ist zu sehen, daß die endogene Synthese der Systeme hoch ist und das Ausmaß der Stimulierung der Aminosäureinkorporation abhängig ist von der Menge der zugesetzten mRNA. Offensichtlich gibt es für die exogen hinzugefügten mRNAs ein

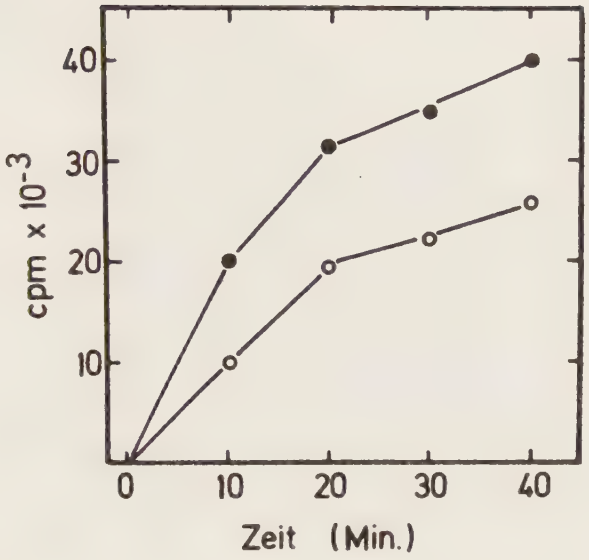

Abbildung 15:

Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese im HeLa-S16-System aus logarithmisch wachsenden Zellen. 1,5A_{260} Einheiten HeLa-S16-Extrakt wurden in 50µl-Inkubationsansatz mit und ohne Histon-mRNA (85µg/ml) unter den in Methoden beschriebenen Translationsbedingungen inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde der Einbau von ^{3}H-Lysin, ^{3}H-Leucin und ^{3}H-Alanin durch Fällen von 7,5µl des Inkubationsgemisches in 20%iger TCA auf Filterpapier bestimmt.
o——o: endogene Synthese
•——•: Histon-mRNA abhängige Synthese.

konzentrationsabhängiges Optimum der Erhöhung der Proteinsynthese; für den Vergleich der Translationseffizienz wurden hier allerdings nur zwei Histon- und Globin-mRNA-Konzentrationen gewählt, die im Weizenkeimlingssystem jeweils vergleichbare Aktivitäten zeigten.

Die Translationsprodukte der beiden In-vitro-Systeme ohne und mit exogener mRNA sind als Fluorogramm in Abbildung 16 dargestellt. Es ist klar zu erkennen, daß HeLa-Histon-mRNA und Globin-mRNA im zellfreien System sowohl aus S-Phase-Zellen (System A) wie auch aus S-Phase-Zellen, in denen die DNA-Synthese für 30 Minuten unterbrochen war (System B), getreu übersetzt werden. Es ist auch deutlich, daß ein signifikanter Anteil der exogenen Produkte des In-vitro-Systems aus S-Phase-Zellen Histone sind (Spur 1), während im zellfreien System B praktisch keine Histone synthetisiert werden (Spur 2).

Die wichtigsten Ergebnisse dieses Experiments sind jedoch, daß

1. das Ausmaß der Synthesesteigerung durch Globin-mRNA mit dem durch Histon-mRNA verursachten in beiden zellfreien Systhemen nahezu identisch ist und daß
2. ein nicht vorbehandeltes Proteinsynthesesystem aus S-Phase-Zellen, in denen durch Blockieren der DNA-Synthese die Histon-mRNA-Translation unterbrochen und es zu einer irreversiblen Inaktivierung dieser mRNAs gekommen war, exogen hinzugefügte Histon-mRNA mit ähnlicher Effizienz wie ein System aus normalen S-Phase-Zellen translatieren kann. Dieses zellfreie System spiegelt also unter den gewählten Bedingungen nicht die In-vitro-Situation wider, d.h. ein Faktor, der die Translation von Histon-mRNA als Folge einer Unterbrechung der DNA-Replikation unterbindet, ist nicht nachweisbar.

Einschränkend muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß diese zellfreien Proteinsynthesesysteme nur schlechte Initiationseigenschaften haben und ein Effekt erst nach mehreren Runden der Translation einer mRNA sichtbar sein könnte.

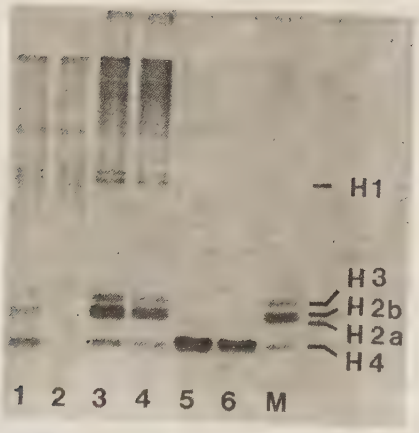

Abbildung 16:

In-vitro-Translationsprodukte von zellfreien Systemen aus HeLa-Zellen. HeLa-S16-Extrakte wurden wie in Tab. 4 beschrieben mit und ohne exogene hinzugefügter mRNA unter Proteinsynthesebedingungen inkubiert. Aliquots der Inkubationsgemische wurden auf einem 15%-Polyacrylamid-Plattengel getrennt. Radioaktive Proteine wurden durch Fluorographie für 9 Tage sichtbar gemacht.

Spur 1: 18µl System A (endogene Synthese)
Spur 2: 18µl System B (endogene Synthese)
Spur 3: 18µl System A + 80µg/ml Histon-mRNA
Spur 4: 18µl System B + 80µg/ml Histon-mRNA
Spur 5: 5µl System A + 32,2µg/ml Globin-mRNA
Spur 6: 5µl System B + 32,2µg/ml Globin-mRNA
Spur M: ^{14}C-Markerhistone aus HeLa-Zellen (2600 cpm)

3.3. Vergleich der Translationseffizienz von HeLa-Histon-mRNA und Globin-mRNA unter dem Einfluß von Histonen in einem zellfreien Proteinsynthesesystem aus Weizenkeimlingen

Aus phageninfizierten Bakterien ist bekannt, daß ein Translationsprodukt der als polycistronische mRNA fungierenden Phagen-RNA die Translation eines Teils dieser RNA blockieren kann. So z.B. inhibiert während des Infektionszyklus das Coatprotein des Phagen Qß durch Bindung an die intercistronische Region zwischen Coatprotein- und Replicasegen die Synthese der Replicase-Untereinheiten. Butler und Mueller (1973) schlugen nun vor, daß nach Blockieren der DNA-Replikation in HeLa-Zellen der Transport neu synthetisierter Histone vom Zytoplasma in den Zellkernen gestört wird und die im Zytoplasma akkumulierten Histone die Translation der Histon-mRNA inhibieren. Wir untersuchten diesen möglichen spezifischen Effekt von Histonen in dem oben beschriebenen zellfreien Proteinsynthesesystem aus Weizenkeimlingen (WG-S30-System), in dem die Translationseffizienz von HeLa-Histon-mRNA und Globin-mRNA verglichen wurde.

Für die folgenden Experimente wurde eine durch Säureextraktion gewonnene und durch Säulenchromatographie gereinigte Histonpräparation aus Kalbsthymus benutzt, die alle fünf Histone in äquivalenten Mengen enthielt. Um den Einfluß dieser Histone auf die Translation von Histon- und Globin-mRNA im WG-S30-System zu testen, wurden sie in Konzentrationen von 0,6-40µg/ml eingesetzt. Die Komponenten des In-vitro-Systems wurden dabei in folgender Reihenfolge gemischt: 1. Histone gelöst in Wasser, 2. die mRNAs in Wasser gelöst und 3. der Weizenkeimlingextrakt, dem bereits alle übrigen Translationskomponenten zugefügt waren. In einigen Experimenten wurden mRNA und Histone bei 0°C für 10 Minuten vorinkubiert, um eine mögliche spezifische Wechselwirkung zu erlauben. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 17 zu sehen. Da eine spezifische Wirkung auf den Translationsablauf eher durch niedrige Histonkonzentration erwartet wurde, wurde der Konzentrationsbereich von 0 bis

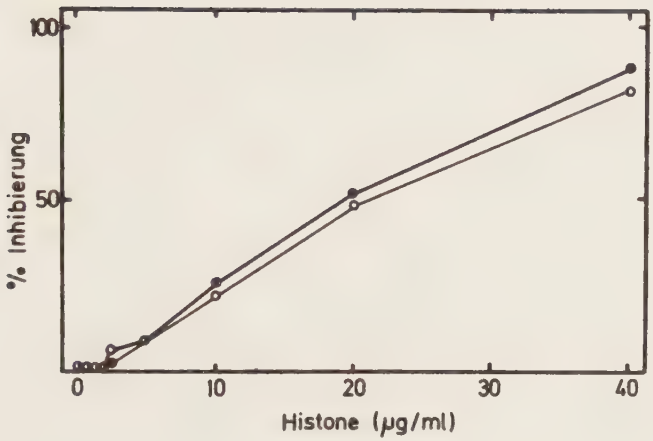

Abbildung 17:

Inhibierung der Histon- und Globinsynthese durch den Einfluß steigender Histon-Konzentration im WG-S30-System. 50ul WG-S30 Translationsgemische, die sättigende Mengen von Histon- (95µg/ml) o——o bzw. Globin-mRNA (35µg/ml) •——• enthielten, wurden mit den angezeigten Histonmengen bei 30°C für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden jeweils 5µl eines jeden Ansatzes in 20%iger TCA auf Whatman-3MM-Papier gefällt und der Einbau von ^{3}H-Lysin und ^{3}H-Leucin in säurefällbare Peptide bestimmt. Die Abnahme des ^{3}H-Aminosäureeinbaus wurde ausgedrückt als % Inhibierung bezogen auf die Einbauraten ohne Histone im Translationsansatz. Die Abbildung gibt die Durchschnittswerte aus zwei Experimenten wieder.

5µg Histone im Testansatz genauer betrachtet. Wie die Ergebnisse in Abbildung 17 jedoch zeigen, ist in diesem Bereich so gut wie keine Translationsinhibierung zu beobachten. Wachsende Histonkonzentrationen inhibieren zwar dann die Proteinsynthese, wahrscheinlich auf Grund ihres basischen Charakters, aber die Inhibierung der Translation von Globin- und Histon-mRNA ist gleich groß.

Um zu überprüfen ob die Konzentration der mRNAs die inhibierende Wirkung der Histone beeinflußt, wurde der gleiche Versuch bei halbsättigenden mRNA-Konzentrationen wiederholt. Abbildung 18 zeigt, daß bei einer Konzentration von 10µg/ml Histon die Translationsinhibierung auf 40% gegenüber 25% bei sättigenden mRNA-Konzentrationen steigt, daß aber auch hier kein Unterschied zwischen den Translationsraten beider mRNA-Präparationen besteht.

Da bei den durch Säureextraktionen gewonnenen Histonen nicht völlig auszuschließen ist, daß durch die drastische Isolierungsmethode ihre natürliche Struktur irreversibel gestört wurde, wurde ein weiteres Experiment mit Histonen durchgeführt, die auf schonende Weise durch Verdrängung mit Protaminen aus HeLa-Chromatin isoliert waren (van der Westhuyzen und von Holt, 1971). Auch diese Histone waren nicht in der Lage, die Translation der Histon-mRNAs spezifisch zu inhibieren.

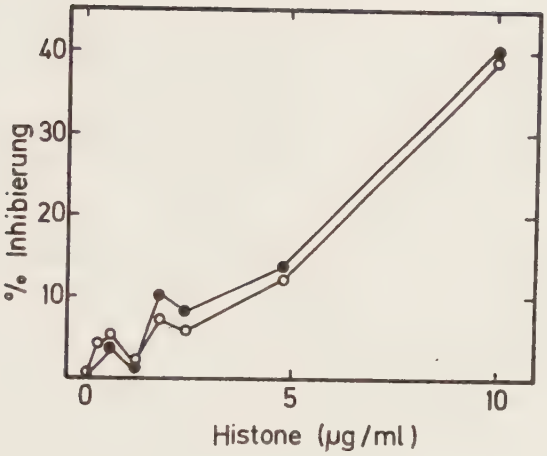

Abbildung 18:

Inhibierung der Synthese von Histon (o——o) und Globin (•——•) bei halbsättigenden mRNA-Konzentrationen durch den Einfluß steigender Histon-Konzentrationen im WG-S30-System. Alle übrigen Bedingungen waren die gleichen wie unter Abbildung 18 angegeben. Die Abbildung gibt die Durchschnittswerte aus zwei Experimenten wieder.

3.4. Phosphorylierung zytoplasmatischer HeLa-Zellproteine unter Bedingungen der Inhibition der DNA-Replikation

Im Retikulozytenlysat wird die Initiation der Proteinsynthese in Abwesenheit von Hämin oder durch Zugabe von doppelsträngiger RNA reversibel blockiert (Farrell et al, 1977). In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß die Translationsinhibierung über die Aktivierung von Faktoren verläuft, die katalytisch die Inaktivierung des Initiationsfaktors eIF-2 bewirken (Maxwell und Kamper, 1971; Hunter 1975). Balkow et al (1975) und Levin et al (1976) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß die Formierung des Methionyl-tRNA·40S Initiationskomplexes durch die Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF-2 gehemmt wird.

Eine spezifische Phosphorylierung von mindestens 2 Proteinen wurde ebenfalls von mehreren Arbeitsgruppen in Translationssystemen aus Interferon-behandelten Zellen gefunden (Lebleu et al, 1976; Ratner et al, 1976; Zilberstein et al, 1976). Während die Phosphorylierung eines Proteins hier, genau wie im Retikulozytenlysat, die Initiation der Proteinsynthese inhibiert (Roberts et al, 1976), scheint die Phosphorylierung eines weiteren Proteins mit der Aktivierung einer Riboendonuklease in Verbindung zu stehen, wodurch eine bevorzugte Degradation viraler mRNAs in solchen Systemen bewirkt wird (Ratner et al, 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, ob die mit der Unterbrechung der DNA-Replikation gekoppelte schnelle Inhibierung der Histonsynthese mit einer Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von bestimmten Proteinen des Translationsapparates, ähnlich wie in den oben angeführten Fällen, einhergeht.

3.4.1. Phosphorylierung von Proteinen in zellfreien Proteinsynthesesystemen von HeLa-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Proteinkinase-Aktivität und die Phosphorylierung bestimmter Proteine mit der Inhibierung der

Translation der Histon-mRNAs verbunden ist, wurden Proteinphosphorylierungen zunächst in vitro und unter Bedingungen der Proteinsynthese untersucht. Die Strategie dieser Experimente war es, die ^{32}P-markierten Proteine durch Gelelektrophorese zu trennen und durch autoradiographische Auswertung der Gele eventuelle spezifische Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der Proteine zwischen S-Phase- und hydroxyharnstoffblockierten Zellen durch Auftauchen oder Fehlen bestimmter Banden sichtbar zu machen.

Analog zu den unter Abschnitt 3.2.3. beschriebenen Bedingungen wurden zwei HeLa-S16-Extrakte aus S-Phase-Zellen und aus S-Phase-Zellen, in denen 15 Minuten vor der Lysis die DNA-Replikation durch Hydroxyharnstoff (4mM) inhibiert war, präpariert. Sofort nach der Präparation wurden die Extrakte durch Chromatographie über Sephadex-G25 von niedermolekularem Material befreit. 0,47A_{260} Einheiten dieser S16-Extrakte wurden in 50µl Ansätzen unter Proteinsynthesebedingungen (siehe Methoden) mit je 5µCi (γ-^{32}P)ATP (aber ohne ^{3}H-markierte Aminosäuren) bei 30°C für 15 Minuten inkubiert. Um im Falle der Kopplung der Phosphorylierung mit dem Vorgang der Translation eine spezifische Proteinphosphorylierung nicht zu übersehen, wurden die In-vitro-Systeme ohne exogene mRNA mit und ohne Cycloheximid (10µg/ml) inkubiert. Alle Ansätze wurden außerdem mit und ohne 3':5'-cAMP inkubiert, um auch die cAMP-abhängigen Proteinkinasen zu erfassen. Unter allen Bedingungen wurde die Phosphorylierung von Proteinen in Abhängigkeit der Translation exogener Histon-mRNA und Globin-mRNA verglichen um zu prüfen, ob eine eventuelle Phosphorylierung mRNA - spezifisch ist. Nach der Inkubation wurden die gesamten Testgemische mit SDS und 2-Mercaptoäthanol für 2 Minuten bei 95°C erhitzt und die Proteine wurden auf einem 10%igen Polyacrylamid-Plattengel elektrophoretisch aufgetrennt. Wie die Abbildungen 19 und 20 zeigen, ist nach dieser Auftrennung der Proteine autoradiographisch keine spezifische Zu- oder Abnahme irgendeiner Bande zu sehen.

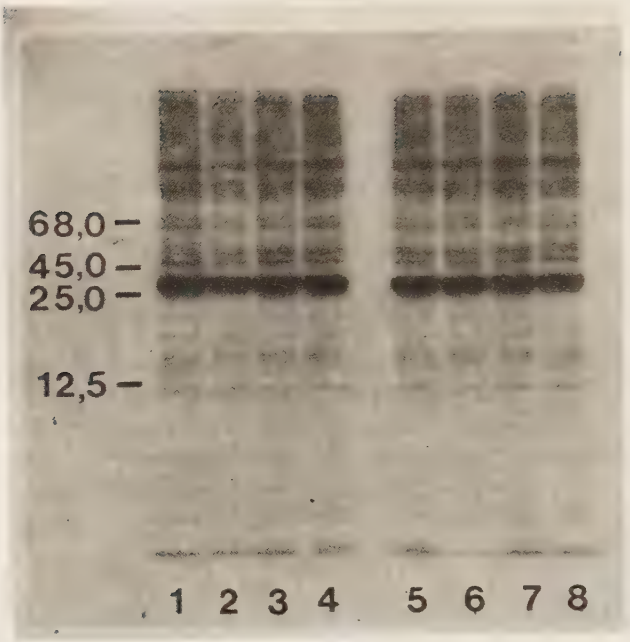

Abbildung 19:

Autoradiogramm der in HeLa-S16-Systemen ^{32}P-markierten phorphorylierten Proteine. Je 20µl HeLa-Zellextrakt(A_{260}: 23 E./ml, A_{280}:17 E/ml)wurden in 50µl Gesamtvolumen unter Proteinsynthesebedingenen mit 5µCi γ-^{32}P-ATP 15 Minuten bei 30°C inkubiert. 15µl eines jeden Ansatzes wurden auf einem 10%-SDS Polyacrylamid-Plattengel mit 5%-Sammelgel durch 9-stündige Elektrophorese bei 50V aufgetrennt. Das Gel wurde mit Amidoschwarz gefärbt, getrocknet und vier Tage bei -80°C autoradiographiert. Ein Gemisch aus Albumin (aus Rinderserum, MG 68 000), Albumin (aus Hühnereiweiß, MG 45 000), Chymotrypsinogen A (MG 25 000) und Cytochrom C (MG 12 500) wurde als Molekulargewichts-Marker mit aufgetrennt. Die Positionen der Markerproteine (Molekulargewicht x 10^{-3}) sind angezeigt.
Die Spuren 1-4 zeigen die Ansätze von HeLa-S16 Extrakten aus S-Phase-Zellen (System A), die Spuren 5-8 die Ansätze mit Extrakten aus geblockten Zellen (System B). Die Ansätze in den Spuren 1, 2 und 5, 6 enthielten keine exogene mRNA, die in den Spuren 2 und 6 enthielten 10µg/ml Cycloheximid. Den Ansätzen in den Spuren 3, 4 und 7, 8 war jeweils 100µg/ml Histon-mRNA bzw. 44µg/ml Globin-mRNA zugesetzt.

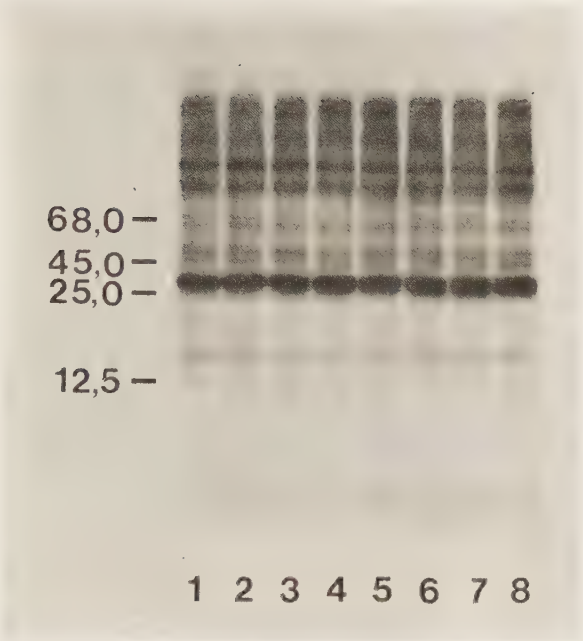

Abbildung 20:
Autoradiogramm in S16-Extrakten in Gegenwart von 10µM cAMP ^{32}P-markierter Proteine.
Inkubationsbedingungen und die Reihenfolge der aufgetragenen Proben sind identisch mit den in Abbildung 19 beschriebenen.

Der Versuch wurde daher in abgewandelter Form wiederholt. Diesmal wurden aus S-Phase- und hydroxyharnstoffblockierten HeLa-Zellen in der gleichen Weise wie beschrieben zwei S16-Extrakte (A und B) hergestellt. Diese wurden jedoch nicht durch eine Sephadex-Gelfiltration von ihren niedermolekularen Anteilen getrennt, um eventuell für eine spezifische Phosphorylierung notwendige kleinmolekulare Faktoren nicht zu verlieren oder eine mögliche Inaktivierung eines extrem labilen Phosphorylierungsfaktors durch den Gelfiltrationsschritt zu vermeiden. Aus einem Teil der beiden S16-Extrakte wurden die Ribosomen durch Zentrifugation gewonnen und mit 0,4M KCl zwecks Extraktion der Initiationsfaktoren gewaschen. Die nicht durch Sephadex filtrierten S16-Zellextrakte wurden unter Proteinsynthesebedingungen mit (γ-^{32}P)ATP phosphoryliert. Einige Ansätze wurden zusätzlich mit je 10µl der ribosomalen Waschfraktion (RWF) unterstützt. Die Proteine wurden nach der Inkubation wie beschrieben behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Autoradiographie in Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes. Ein Unterschied im Muster der radioaktiv markierten Proteinbanden ist nach Phosphorylierung weder der ribosomalen Waschfraktionen noch der S16-Extrakte in Anwesenheit oder Abwesenheit der beiden ribosomalen Waschfraktionen zu beobachten.

3.4.2. Phosphorylierung von Proteinen in vivo in S-Phase-Zellen und Hydroxyharnstoff-blockierten S-Phase-Zellen

Da in allen bisher beschriebenen In-vitro-Experimenten die Regulation der Unterbrechung der Histon-mRNA-Translation nach Blockierung der DNA-Synthese nicht nachvollzogen werden konnte, ist auch im Hinblick auf eventuelle spezifische Phosphorylierungsreaktionen an die Möglichkeit zu denken, daß durch die Zellfraktionierung sehr empfindliche Proteine inaktiviert oder degradiert werden könnten. Da außerdem die Phosphorylierung eines bestimmten Faktors sehr schnell ablaufen und bereits 15 Minuten nach der DNA-Blockierung ein Maximum erreicht haben könnte, wurden im Folgenden in

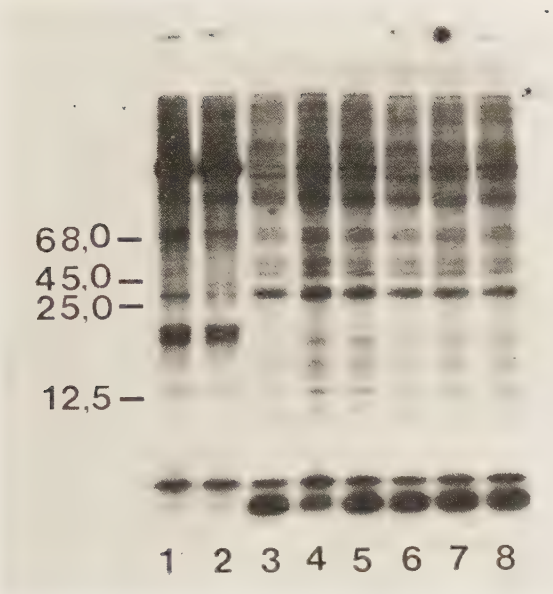

Abbildung 21:

Autoradiogramm ^{32}P-markierter Proteine, die im HeLa-S16-Translationssystem unter Mitwirkung ribosomaler Waschfraktion phosphoryliert wurden. Alle Ansätze enthielten 60µg/ml einer Histon-mRNA Präparation, sowie 10µM cAMP und wurden unter Translationsbedingungen mit 10µCi ^{32}P-ATP in einem Gesamtvolumen von 50µl 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Spuren 1 und 2: phosphorylierte Proteine in ribosomaler Waschfraktion aus S-Phase- (1) und Hydroxyharnstoff-blokkierten Zellen (2), Spuren 3 und 6 je 16,5µl HeLa-S16-Extrakt (A_{260}:94 E/ml, A_{280}:60 E/ml) aus S-Phase (3) und geblockten Zellen (6) ohne ribosomale Waschfraktion, Spuren 4 und 5: 16,5µl HeLa-S16-Extrakt aus S-Phase-Zellen und zusätzlich 10µl ribosomale Waschfraktion aus S-Phase (4) und geblockten Zellen (5), Spuren 7 und 8: 16,5µl HeLa-S16-Extrakt aus geblockten Zellen und zusätzlich 10µl ribosomale Waschfraktion aus S-Phase (7) und geblockten Zellen (8).

intakten HeLa-Zellen die Phosphatgruppen der Proteine durch anorganisches ^{32}P markiert und das Proteinphosphorylierungsmuster in Zellen verschiedenen Zustandes hinsichtlich der DNA-Synthese verglichen. Hierbei wurde zusätzlich durch Fraktionierung der postmitochondrialen Überstände die Anreicherung der phosphorylierten Proteine erhöht und somit eine größere Nachweisempfindlichkeit geschaffen.

Eine Kultur synchronisierter HeLa-Zellen zwei Stunden nach Eintritt in die S-Phase wurde geviertelt, und die Zellen wurden in phosphatfreies Medium überführt. Zu jeder der 100ml-Kulturen ($6x10^5$ Zellen/ml) wurden 2,5mCi ^{32}P-Orthophosphat hinzugegeben. Die Kulturen I und II dienten als Kontrolle, während in den Kulturen III und IV 5 Minuten nach Zugabe des markierten Phosphats die DNA-Synthese mit 4mM Hydroxyharnstoff bzw. mit 40µg/ml Cytosinarabinosid blockiert wurde. Alle Kulturen wurden für weitere 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, in Gegenwart von 0,2% Triton x 114 lysiert und Zellfragmente, Zellkerne und Mitochondrien durch Zentrifugation bei 16 000xg entfernt. Die S16-Extrakte wurden auf 15-40%igen Sucrosegradienten in 4 Fraktionen aufgetrennt: a) schwere Polyribosomen, b) leichte Polyribosomen, c) Monosomen und ribosomale Untereinheiten und d) Material mit einer Sedimentationskonstanten kleiner als 40S (siehe Abbildung 22). Wie in Abbildung 22 gut zu sehen ist, nimmt unter der Wirkung von Hydroxyharnstoff der Anteil der leichten Polyribosomen, an denen auch Histon-mRNAs translatiert werden (etwa 2-7 Ribosomen/mRNA-Molekül), deutlich sichtbar ab. Die Proteine der 4 Gradientenfraktionen wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Plattengel mit 5%igem Sammelgel aufgetrennt. Die autoradiographische Auswertung eines typischen Experimentes ist in Abbildung 23 zu sehen. Die Blockierung der DNA-Synthese sowohl mit Hydroxyharnstoff als auch mit Cytosinarabinosid gibt auch in diesem Experiment keinerlei Hinweis auf eine mögliche spezifische Phosphorylierung eines Proteins in Verbindung mit der Unterbrechung der Translation der Histon-mRNAs.

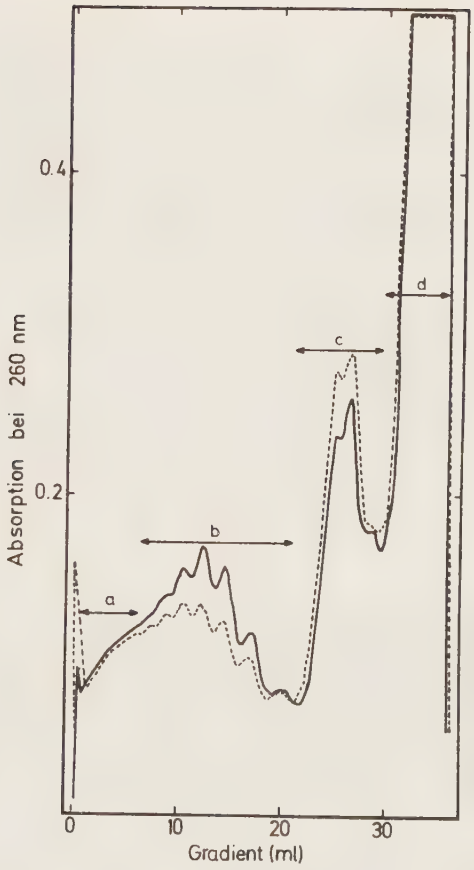

Abbildung 22:

Sucrosegradienten-Zentrifugation zytoplasmatischer Extrakte. 100ml Kulturen synchronisierter HeLa-Zeller 2,5 Stunden nach Eintritt in die S-Phase wurden in phosphatfreiem Medium mit je 2,5mCi ^{32}P-Orthophosphat für 30 Minuten inkubiert. 5 Minuten nach Zugabe von ^{32}P-Orthophosphat wurde in den Zellen einer Kultur die DNA-Synthese mit 4mM Hydroxyharnstoff blockiert. Die 16 000xg Extrakte von Kontrolle (——) und blockierten Zellen (----) wurden durch 15-40% Sucrosegradienten zentrifugiert. Die durch die Pfeile angezeigten Fraktionen wurden gesammelt und die Proteine gelelektrophoretisch getrennt (Abbildung 23).

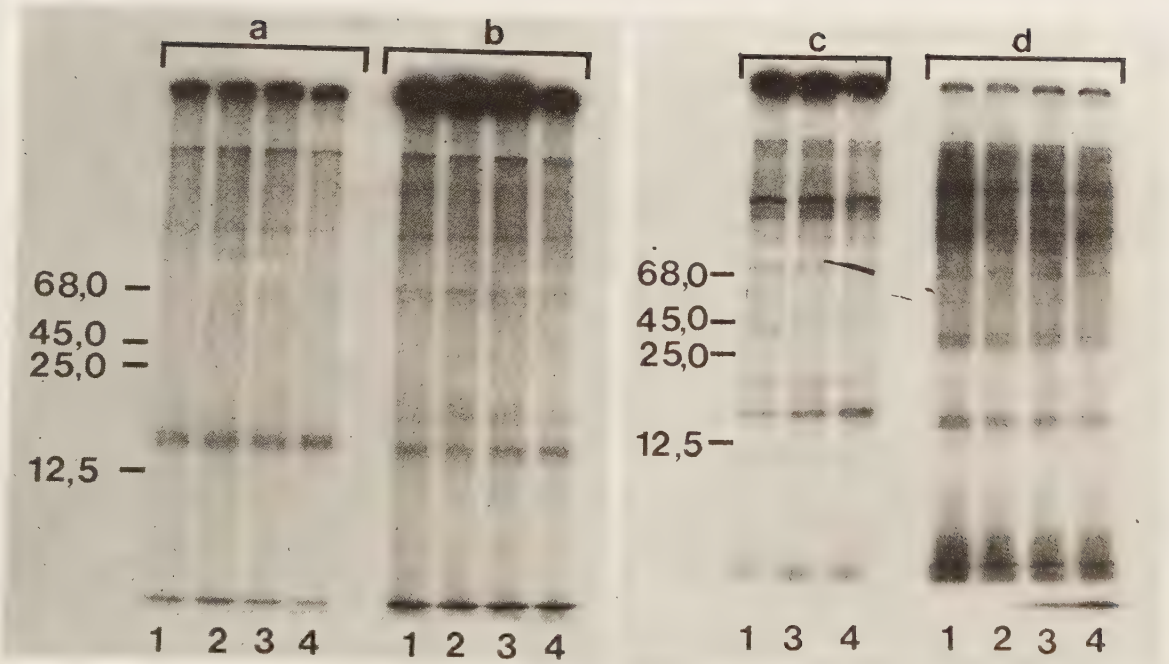

Abbildung 23: Autoradiogramm der unter Abbildung 22 fraktionierten zytoplasmatischen Extrakte. Die Äthanolpräcipitate aus Abbildung 22 wurden in SDS-Probenpuffer aufgelöst und 0,2 E_{A280} einer jeden Fraktion wurden auf einem 10%-SDS-Polyacrylamid-Plattengel durch Elektrophorese bei 50V über 9 Stunden aufgetrennt. Die Spuren 1 und 2 zeigen phosphorylierte Proteine aus unbehandelten HeLa-Zellen in S-Phase (Kontrolle), die Spur 3 aus Hydroxyharnstoff-behandelten Zellen und Spur 4 aus Cytosinarabinose-behandelten Zellen. Die mit Buchstaben bezeichneten und zusammengefaßten Spuren entsprechen den in Abbildung 22 isolierten Fraktionen.

IV Diskussion

Die Synthese eines Proteins kann im Prinzip auf mehreren Ebenen reguliert werden: 1. durch die präferentielle Replikation des zugehörigen Strukturgens, 2. seine bevorzugte Transkription, 3. die Prozessierung der mRNA, 4. durch Transport der mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma, 5. durch die Bindung der mRNA an Ribosomen und die Initiation der Proteinsynthese, 6. die Stabilität der mRNA und 7. die Reifung des Proteins zu seiner Endform, wie z.B. durch spezifische proteolytische Spaltung oder Addition von Acetyl- oder Phosphatresten. Um zu bestimmen, auf welcher Stufe die Synthese eines bestimmten Proteins reguliert wird, bedarf es unter anderem einer genauen Messung seiner Syntheserate, der Konzentration der entsprechenden mRNA und jeglicher mRNA-Vorstufen. Während der zytoplasmatische Gehalt vieler bekannter mRNAs heute durch Translation in zellfreien Systemen oder durch Hybridisierung gegen eine komplementäre DNA relativ genau quantitiert werden kann, erfordert die Bestimmung der mRNA-Sequenzen in den Präkursoren auf Grund ihres geringen Anteils an der gesamten Kern-RNA und zum Teil sehr hoher und schneller Prozessierungsraten (Britten und Davidson, 1971; Molloy et al, 1974) große Messgenauigkeit und ist nicht unproblematisch.

Für die Histone konnte gezeigt werden, daß das Anschalten ihrer mit der DNA-Replikation gekoppelten Synthese auf der Ebene der Transkription reguliert wird. Durch die erwähnte Amplifikation der Histongene ist eine Zelle dabei in der Lage, die mit Beginn der DNA-Replikation für die Histonsynthese erforderliche Menge Histon-mRNA schnellstens zu synthetisieren. Auch das Abschalten der Histonsynthese geht mit einem Stopp der Histon-mRNA-Transkription einher. Die experimentellen Daten aus mehreren Labors zeigen nämlich, daß z.B. in HeLa-Zellen Histon-mRNAs nur während der S-Phase des Zellzyklus im Zytoplasma vorhanden sind (Borun et al, 1967; Gallwitz und Mueller, 1969; Perry und Kelly, 1973; Breindl und Gallwitz, 1974; Stein et al, 1975; Borun

et al, 1975). Das Abschalten der Transkription allein reicht jedoch nicht aus, um den schnellen Rückgang der Histonsynthese nach Beendigung der DNA-Synthese zu erklären.

Histon-mRNAs werden zu Beginn und während der ersten Stunden der DNA-Replikationsphase synthetisiert (Borun et al, 1967; Breindl und Gallwitz, 1974) und sind für die Länge einer S-Phase stabil (Perry und Kelly, 1973). Nach Unterbrechung der DNA-Synthese werden sie mit einer Halbwertszeit von 10-13 Minuten degradiert (Gallwitz, 1975; Stahl und Gallwitz, 1977). Die Unterbrechung der Histonsynthese am Ende der S-Phase ist daher die Konsequenz der Inaktivierung zytoplasmatischer Histon-mRNA. Dieser Inaktivierung liegt ein spezifischer Kontrollmechanismus zugrunde, der entweder auf der Stufe der Translation oder aber translationsunabhängig operieren könnte.

Alle bisher durchgeführten Experimente, die selektive Inhibierung der Translation von Histon-mRNA in zellfreien Proteinsynthesesystemen von Zellen, in denen die DNA-Replikation blockiert war, nachzuvollziehen, verliefen ergebnislos (Breindl und Gallwitz, 1974; Gabrielli und Baglioni, 1974). Die Abhängigkeit der Histon-mRNA-Translation z.B. von spezifischen Initiationsfaktoren ist schon deshalb unwahrscheinlich, da Histon-mRNAs sehr effizient in Lysaten von Retikulozyten translatiert werden (Gallwitz und Breindl, 1972; Breindl und Gallwitz, 1973), in Zellen also, in denen Histone überhaupt nicht gebildet werden. Auch eine Präparation von Initiationsfaktoren aus HeLa-Zellen in S-Phase erwies sich als ebenso effektiv in der Unterstützung der Translation von Histon-mRNA in einem Initiationsfaktorabhängigen Proteinsynthesesystem wie eine Präparation von Initiationsfaktoren aus Zellen, in denen die DNA-Synthese blockiert war (Breindl und Gallwitz, 1974).

Ein erster Hinweis darauf, wie die zytoplasmatische Regulation der Inaktivierung von Histon-mRNA nach Unterbrechung der DNA-Replikation verlaufen könnte, war der Befund, daß Cycloheximid die Degradation dieser mRNAs in Hydroxyharnstoff-blockierten Zellen verhindert (Gallwitz, 1975). Es

wurde angenommen, daß nach Unterbrechung der DNA-Replikation die Reinitiation der Histon-mRNA-Translation blockiert wird und daß als Konsequenz die Histon-mRNA, dann nicht mehr durch Ribosomen geschützt, auf Grund besonderer struktureller Eigenschaften sofort degradiert wird. Es wurde auf Grund dieses Befundes ebenfalls diskutiert, daß die Inaktivierung der Histon-mRNA ein translationsabhängiger Vorgang ist. Die Aussagen des geschilderten Cycloheximid-Experimentes sind aber dadurch eingeschränkt, daß Cycloheximid durch Hemmung der Elongation der Proteinsynthese ein Auseinanderfallen von Polyribosomen verhindert, und man kann deshalb argumentieren, daß das Intaktbleiben der Histon-mRNAs unter solchen Bedingungen durch den Schutz der Ribosomen vor einer Nucleaseverdauung bedingt ist (Gallwitz, 1975).

Um den Fragen nachzugehen, ob in der Tat die rasche Inaktivierung der Histon-mRNAs 1. ein translationsabhängiger Prozess ist und 2. ob die Histon-mRNAs nach Dissoziation von den Ribosomen durch zelluläre Nucleasen selektiv degradiert werden, wurden Untersuchungen über das Schicksal der Histon-mRNAs in HeLa-Zellen durchgeführt, in denen die Initiation der Proteinsynthese total blockiert wurde.

In eukaryonten Zellen in Kultur kann die Initiation der Proteinsynthese reversibel gehemmt werden z.B. durch Erhöhung der Temperatur von 37°C auf 42°C oder durch die Erhöhung der Osmolarität des Wachstumsmediums. Unter solchen Bedingungen zerfallen die Polyribosomen innerhalb weniger Minuten und der Hauptanteil der zellulären mRNAs überlebt für gewisse Zeit in Form von Ribonucleoprotein-Partikeln oder gebunden an Monosomen (Saborio et al, 1974; McCormick und Penman, 1969; Schochetman und Perry, 1972). Für unsere Untersuchungen stützten wir uns auf die Beobachtung von Saborio et al (1974), daß in logarithmisch wachsenden HeLa-Zellen eine Erhöhung der NaCl-Konzentration des Kulturmediums (Eagle's minimum essential medium) um 100mM innerhalb von etwa 5 Minuten zur vollständigen Inhibierung des Einbaus von Aminosäuren in zelluläres Protein und zur Disaggregierung aller Polyribosomen führt.

Wir fanden nun, daß in Suspensionskulturen synchronisierter HeLa-Zellen in der Mitte der S-Phase die NaCl-Konzentration um 150mM angehoben werden mußte, um einen nahezu vollständigen Zerfall der Polyribosomen und eine Proteinsyntheseinhibierung um mindestens 90% zu erzielen. Saborio et al (1974) hatten bereits beobachtet, daß in virusinfizierten Zellen höhere NaCl-Konzentrationen zur totalen Hemmung der Proteinsynthese notwendig sind und daß die Initiation der Translation viraler mRNAs schwerer zu blockieren ist.

Eine Analyse der unter den Bedingungen erhöhter Osmolarität in S-Phase-Zellen noch synthetisierten Polypeptide zeigte überraschenderweise fast ausnahmslos Histone. Hieraus kann man schließen, daß die Histon-mRNAs, ähnlich wie virale mRNAs, eine relativ hohe Affinität zu Ribosomen haben. Allerdings waren nicht mehr als 10-20% der totalen zytoplasmatischen Histon-mRNA nach NaCl-Behandlung für 30 Minuten noch an Polyribosomen gebunden. Dieser Wert stellt im übrigen eine obere Grenze dar, da die von den Gradienten isolierte Polyribosomenfraktion mit Monosomen verunreinigt war, an die wiederum 40-50% der gesamten zytoplasmatischen Histon-mRNA gebunden war.

Ein Vergleich der Inaktivierungskinetiken der zytoplasmatischen Histon-mRNA unter Bedingungen der Hemmung der DNA-Replikation einerseits und der Initiation der Proteinsynthese andererseits zeigte einen sehr bedeutsamen Unterschied. Während die Unterbrechung der DNA-Synthese zu einem exponentiellen Verlust der translatierbaren zytoplasmatischen Histon-mRNA mit einer Halbwertszeit von nur 10-13 Minuten führte, verursachte die Inhibierung der Initiation der Proteinsynthese nur eine geringgradige Inaktivierung dieser mRNAs. So wurden nur 10-15% der totalen Histon-mRNA während einer NaCl-Behandlung von 30 Minuten inaktiviert. Die beobachteten unterschiedlichen Halbwertszeiten können nicht durch eine unterschiedliche Syntheserate neuer Histon-mRNA erklärt werden, da die Experimente mit synchronisierten Zellen durchgeführt wurden, die sich zwischen der dritten und vierten Stunde der S-Phase befanden. Die Menge der zyto-

plasmatischen Histon-mRNA ändert sich während dieser Zeit nur wenig bedingt durch eine relativ niedrige Histon-mRNA-Syntheserate (Breindl und Gallwitz, 1973).

Durch Fraktionierung der postmitochondrialen Zellüberstände und anschließender Titration der translatierbaren Histon-mRNA-Mengen wurde deutlich, daß in NaCl-behandelten Zellen ungefähr 40-50% der gesamten Histon-mRNA in Form von mRNA·Proteinpartikeln vorliegt, die zwischen 15S und 30S sedimentieren. Weitere 40% dieser mRNAs waren an Monosomen gebunden. Ähnliche Resultate wurden gefunden, wenn in NaCl-behandelten Zellen zusätzlich die RNA-Synthese durch Actinomycin D (5µg/ml) blockiert wurde. Daraus kann geschlossen werden, daß eine signifikante Menge der Histon-mRNA, die vorher in Polyribosomen translatiert wurde, nach Inhibierung der Initiation der Proteinsynthese im Zytoplasma als mRNA·Proteinpartikeln überlebt. Diese Ergebnisse sind deshalb bedeutungsvoll, da 1. unter normalen Wachstumsbedingungen nur geringe Mengen von Histon-mRNA nicht ribosomal gebunden sind und 2. unter Bedingungen der Inhibierung der DNA-Replikation Histon-mRNAs nicht im Zytoplasma überleben (Breindl und Gallwitz, 1974; Borun et al, 1975). Die Histon-mRNAs unterscheiden sich also nach einer Hemmung der Initiation der Proteinsynthese nicht von anderen zellulären Messengers. Insbesondere ist bemerkenswert, daß die Ablösung der Histon-mRNAs von den Ribosomen nicht zu einer selektiven Degradation dieser mRNAs führt. Die Inhibierung der Reinitiation der Histon-mRNA könnte daher schon theoretisch nicht der alleinige Grund für den nach Unterbrechung der DNA-Synthese beobachteten Abbau dieser mRNAs sein.

Wir schlagen vor, daß ein Histon-mRNA destabilisierender Faktor existieren muß, der im Zytoplasma aktiviert oder verfügbar wird, sobald die DNA-Replikation stoppt. Wir vermuten, daß ein solcher Faktor spezifisch mit den Histon-mRNAs in Wechselwirkung tritt und zur Degradation dieser mRNAs führt. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Translationsmaschinerie der Zellen nach Blockierung der DNA-Replikation in spezifischer oder unspezifischer Weise so

verändert wird, daß die Initiation der Translation speziell der Histon-mRNAs unterbunden wird. Hiergegen spricht unsere Beobachtung, daß Histon-mRNAs eine relativ hohe Ribosomenaffinität besitzen und deshalb, ähnlich wie Pikornaviren-RNA, eher bevorzugt translatiert werden sollten (Carrasco und Smith, 1976). In diesem Zusammenhang scheint es interessant, daß für die Degradation von viralen mRNAs durch eine Interferon-aktivierte Endoribonuclease kein Unterschied zwischen ribosomengebundenen und freien mRNAs besteht (Ratner et al, 1977).

Der Histon-mRNA-destabilisierende Faktor könnte ein Protein sein, und in diesem Fall sind zwei Möglichkeiten vorstellbar. Entweder muß ein solcher Faktor nach Unterbrechung der DNA-Synthese neu synthetisiert werden oder er muß bereits in S-Phase-Zellen vorhanden sein und aktiviert werden, sobald die DNA-Replikation unterbrochen wird.

Es ist vorstellbar, daß dieser hypothetische destabilisierende Faktor, z.B. eine Nuclease, durch chemische Modifikation aktiviert wird. Dies könnte z.B. durch eine Änderung des Nucleotidpools nach Unterbrechung der DNA-Synthese ausgelöst werden. Eine solche Aktivierung einer Nuclease durch Phosphorylierung eines schon vorhandenen Proteins findet wahrscheinlich in Extrakten aus Interferon-behandelten Zellen nach Zugabe von doppelsträngiger-RNA statt (Ratner et al, 1977). In diesem System konnte man nämlich neben der spezifischen Phosphorylierung von zwei Proteinen durch ATP (Lebleu et al, 1976; Roberts et al, 1976; Zilberstein et al, 1976) auch die ATP-abhängige Aktivierung einer Nuclease nachweisen, die spezifisch virale mRNAs degradiert (Brown et al, 1976).

Unsere In-vitro-Versuche, unter Proteinsynthesebedingungen eine Phosphorylierung als möglichen Aktivierungsschritt eines Translationsinhibitors nachzuweisen, zeigten keine spezifischen Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der Proteine zwischen S-Phase- und hydroxyharnstoffblockierten Zellen. Auch Versuche in ganzen Zellen gaben keinen Hinweis auf eine mögliche spezifische Phosphorylierung eines Proteins

in Verbindung mit der Unterbrechung der Histonsynthese.

Unser Ergebnis, daß die laufende Proteinsynthese für die Histon-mRNA-Inaktivierung nötig ist, könnte andererseits darauf hindeuten, daß für die Degradation der Histon-mRNAs ein sehr kurzlebiges Protein notwendig ist. Dieses Protein könnte z.B. eine Nuclease sein. In diesem Zusammenhang sei allerdings daran erinnert, daß RNA-Synthese nicht für die Unterbrechung der Histonsynthese nach Inhibierung der DNA-Replikation erforderlich ist (Butler und Mueller, 1973).

Attraktiv erscheint zunächst die von Butler und Mueller (1973) vorgeschlagene Hypothese, daß nach Inhibierung der DNA-Replikation im Zytoplasma akkumulierte Histone durch Bindung an die Histon-mRNAs deren Abbau einleiten. Wie bereits diskutiert, ist aus Qß-Phagen-infizierten Bakterien ein ähnlicher Translations-Kontrollmechanismus bekannt (Kolakowsky und Weissmann, 1971), wobei nämlich ein Translationsprodukt bei einer offenbar kritischen Konzentration die Translation einer anderen mRNA durch Bindung an eine spezifische Nucleotidsequenz der polycistronischen Messenger blockiert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Versuche, eine solche spezifische Verhinderung der Translation von HeLa-Histon-mRNAs durch Histone in einem zellfreien Proteinsynthesesystem nachzuweisen, konnte diese Hypothese allerdings nicht unterstützen. Weder säureextrahierte noch durch Verdrängung mit Protamin aus dem Chromatin schonend präparierte Histone zeigten eine spezifische Inhibierung der Histon-mRNA-Translation im Vergleich zur Translation von Globin-mRNA. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Gabrielli und Baglioni (1974) überein, die in einem zellfreien System von Ascites-Zellen ebenfalls zeigten, daß durch Histone, wahrscheinlich auf Grund des basischen Charakters dieser Proteine, die Translation von Histon-mRNA genau wie von Globin-mRNA nur unspezifisch gehemmt wird. Die bei den hier durchgeführten Experimenten im Weizenkeimlingssystem beobachtete viel höhere Empfindlichkeit der Translation gegenüber Histonen ist auffallend. Während

Gabrielli und Baglioni eine 50%ige Inhibierung der Proteinsynthese bei einer Konzentration von ca. 140mg/ml Histonen erreichen, wurde dies im Weizenkeimlingssystem bereits bei ca. 20µg/ml erreicht. Da der Grad der Inhibierung nicht nur von der Histon-Proteinkonzentration sondern auch von der Konzentration der eingesetzten mRNAs abhängt, wurde, im Gegensatz zu den von Gabrielli und Baglioni durchgeführten Arbeiten, von uns nur hinsichtlich ihres Sättigungsgrades für das WG-S30-System gleiche mRNA-Mengen verglichen. Wie die Ergebnisse zeigen, erhält man bei halbsättigenden mRNA-Konzentrationen gegenüber sättigenden eine um ca. 90% höhere Inhibierung der Translation durch gleiche Histonmengen, was darauf hindeuten könnte, daß die Histone in erster Linie mit der mRNA und nicht mit dem Translationsapparat in Wechselwirkung treten. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß eine mRNA-spezifische Wechselwirkung von Histonen und Nucleinsäuren in dem z.B. im Hinblick auf die Initiation mangelhaften WG-S30-System nicht nachweisbar ist, jedoch in vivo stattfindet.

Dem hier gemachten Befund der Abhängigkeit der Histon-mRNA-Degradation von der laufenden Proteinsynthese könnte entgegengehalten werden, daß durch die Erhöhung der NaCl-Konzentration ein für den mRNA-Abbau bereits vorhandener Faktor (z.B. eine Nuclease) seine Aktivität verlieren könnte. Wir können diese Möglichkeit nicht ausschließen, obwohl dann die nach Cycloheximidbehandlung beobachtete Stabilität der Histon-mRNA in DNA-Synthese-blockierten Zellen (Gallwitz, 1975) als Ergebnis des Schutzes dieser mRNA durch die Bindung an die Ribosomen gesehen werden müßte. Dagegen allerdings sprechen Hybridisierungsexperimente von Melli et al (1977) welche zeigen, daß de novo synthetisierte Histon-mRNA-Moleküle im Zytoplasma solcher Zellen nachweisbar sind. Dies bedeutet, daß trotz der Unterbrechung der DNA-Replikation unter Cycloheximid Histon-mRNA synthetisiert wird und das Zytoplasma erreicht, wo sie auf Grund der blockierten Proteinsynthese nicht in einem Polyribosomenverband integriert werden dürfte und trotzdem überlebt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nochmals versucht, durch Verfeinerungen der Methoden und gezielte Wahl der zellfreien Proteinsynthesesysteme einen spezifischen Translationsinhibitor nachzuweisen. Bereits Gabrielli und Baglioni (1974) und Breindl und Gallwitz (1974) hatten keine unterschiedliche Translationseffizienz von Histon-mRNA gegenüber anderen mRNAs, weder in zellfreien Proteinsynthesesystemen von HeLa-Zellen in S-Phase oder Hydroxyharnstoff- (bzw. Cytosinarabinosid-) behandelten S-Phase-Zellen, zeigen können.

Hier wurde untersucht, ob sich im postribosomalen Überstand blockierter S-Phase-Zellen ein die Translation von Histon-mRNA spezifisch inhibierender Faktor nachweisen läßt. Für diese Untersuchungen wurde das Weizenkeimlingsystem gewählt, das sich durch sehr geringe endogene Synthese auszeichnet, was wiederum eine gute Auswertung der Ergebnisse ermöglicht (Marcu und Dudock, 1974). Auch in dieser Versuchsanordnung, bei der besonderer Wert auf die Schnelligkeit der Präparation der Überstandsproteine Wert gelegt wurde, um mögliche Inaktivierungen labiler Faktoren einzuschränken, konnte kein Effekt auf die Histon-mRNA-Translation in vitro gezeigt werden.

Um weiterhin alle denkbaren Fremdeinflüße bei der Untersuchung der zytoplasmatischen Kontrolle der HeLa-Zell-Histonsynthese auszuschließen, wurde schließlich ein homologes zellfreies Translationssystem ohne Präinkubation oder Sephadex-Gelfiltration benutzt. Da das zellfreie Proteinsynthesesystem aus HeLa-Zellen im Vergleich zum zellfreien System aus Krebs-Ascites-Zellen arm an Initiationsfaktoren ist (Gabrielli und Baglioni, 1974) und ohne Vorinkubation dazu eine sehr hohe endogene Synthese zeigt, wurde dieses System mit Retikulozyten-Initiationsfaktoren unterstützt. Diese Retikulozytenfaktoren dürften die Translation von Histon-mRNA in einer unspezifischen Weise stimulieren, da Histone in Retikulozyten nicht synthetisiert werden. Es wurde gefunden, daß alle zellfreien Systeme aus synchronisierten HeLa-Zellen in S-Phase oder von Hydroxyharnstoff-blockierten S-Phase-Zellen Histon-mRNA mit gleicher Effizienz trans-

latierten. Dieses Experiment macht es auch unwahrscheinlich, daß ein labiler Faktor während des Präinkubationsschrittes inaktiviert wird, wie es für andere Translationsinhibitoren berichtet wurde (Friedman et al, 1972). Es scheint möglich, daß, wie von Gabrielli und Baglioni (1974) diskutiert, ein Translationsinhibitor in stöchiometrischen Mengen zur vorhandenen Histon-mRNA synthetisiert wird. Falls dieser hypothetischer Inhibitor nach Bindung an die mRNA inaktiviert würde, so wäre er mit Hilfe dieses Experiments nicht nachweisbar, da die Histon-mRNA im Verhältnis zu ihrer physiologischen Konzentration im Überschuß eingesetzt wurde.

Auf Grund aller geschilderten experimentellen Ergebnisse scheint es weitaus aussichtsreicher, die zytoplasmatische Kontrolle der Histonsynthese in Zellen, wie z.B. der Hefe, zu untersuchen, wo Zellzyklusmutanten mit Defekten in der Initiation und Elongation der DNA-Replikation zur Verfügung stehen.

V Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen über das zytoplasmatische Abschalten der Histonsynthese in HeLa-Zellen durchgeführt.

Die Stabilität der zytoplasmatischen Histon-mRNA in HeLa-Zellen in S-Phase wurden unter Bedingungen untersucht, unter denen die Initiation der Proteinsynthese durch Erhöhung der Osmolariät des Wachstumsmediums mit NaCl inhibiert war. Biologisch aktive Histon-mRNA wurde durch Translation in einem zellfreien Proteinsynthesesystem aus Retikulozyten quantitiert. Dabei wurde folgendes gefunden:

1. Während die Unterbrechung der DNA-Replikation mit Hydroxyharnstoff zu einer exponentiell verlaufenden Degradation der translatierbaren Histon-mRNA mit einer Halbwertzeit von 10-13 Minuten führt, ist nach Blockieren der Initiation der Proteinsynthese nur ein leichter Rückgang der biologisch aktiven Histon-mRNA im Zytoplasma zu verzeichnen. Unter diesen Bedingungen ließen sich 40-50% der totalen zytoplasmatischen Histon-mRNA, die vorher in Polyribosomen translatiert wurden, als mRNA • Proteinpartikel mit einer Sedimentationskonstante von 15S-30S im Zytoplasma nachweisen. In unbehandelten Zellen oder in Zellen, in denen die DNA-Replikation mit Hydroxyharnstoff blockiert wurde, waren dagegen nur 3-6% der totalen translatierbaren Histon-mRNA im Zytoplasma, d.h. nicht an Ribosomen oder deren Untereinheiten gebunden, nachweisbar.

2. Da die gleichzeitige Inhibierung der RNA-Synthese durch Actinomycin D und der Initiation der Proteinsynthese durch hypertone Behandlung der S-Phase-Zellen zu den selben experimentellen Ergebnissen führte, konnte eine erhöhte De-novo-Synthese für die nicht ribosomengebundene Histon-mRNA ausgeschlossen werden.

Aus den Befunden 1 und 2 folgt, daß die Inhibierung der Initiation der Proteinsynthese allein daher nicht der Grund für den schnellen Abbau der Histon-mRNA nach Unterbrechung

der DNA-Replikation sein kann.

Die Inaktivierung dieser mRNAs muß vielmehr als ein Prozess gesehen werden, der von der laufenden Proteinsynthese abhängt.

3. Um zu überprüfen, ob neu synthetisierte, im Zytoplasma nach Unterbrechung der DNA-Replikation akkumulierte Histone die Translation der Histon-mRNA selektiv inhibieren, wurde der Einfluß von Histonen auf die Translation von Histon-mRNA in einem zellfreien Proteinsynthesesystem aus Weizenkeimlingen untersucht. Weder säureextrahierte noch durch Verdrängung mit Protamin aus Chromatin schonend präparierte Histone zeigten eine spezifische Inhibierung der Histon-mRNA-Translation im Vergleich zur Translation von Globin-mRNA.

4. Weiter wurde versucht, durch Verfeinerung der Methoden und gezielte Wahl der Proteinsynthesesysteme einen Histon-mRNA-spezifischen Translationsinhibitor nachzuweisen. Durch Experimente im Weizenkeimlingsystem konnte jedoch kein die Translation von Histon-mRNA spezifisch inhibierender Faktor im postpolyribosomalen Überstand blockierter S-Phase-Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich, daß trotz schonenster Präparation zellfreie Systeme aus synchronisierten HeLa-Zellen in S-Phase oder von Hydroxyharnstoff-blockierten S-Phase-Zellen Histon-mRNA mit gleicher Effizienz wie Globin-mRNA translatieren.

5. Es wurde untersucht, ob eine Phosphorylierung spezifischer Protein(e) mit dem Prozess der selektiven Degradation der Histon-mRNA gekoppelt ist. Unter Bedingungen der Hemmung der DNA-Replikation konnten nach Pulsmarkierung mit anorganischem ^{32}P-Phosphat keine selektiv phosphorylierten Proteine weder im partikelfreien Zytoplasma noch an Polyribosomen verschiedener Größe gefunden werden. In-vitro-Phosphorylierung von Proteinen mit γ-^{32}P-ATP unter Bedingungen der Proteinsynthese wurde in S16-Extrakten von HeLa-Zellen in S-Phase oder in Hydroxyharnstoff-blockierten S-Phase-Zellen untersucht. Ein Unterschied im Proteinphosphorylierungsmuster konnte nicht beobachtet werden, unabhängig

davon, ob die Phorphorylierung in An- oder Abwesenheit von cAMP oder während der Translation verschiedener mRNAs durchgeführt wurde.

Als wichtigstes Ergebnis kann man bezeichnen, daß mit Hilfe der durchgeführten Experimente kein für die Regulation der Histonsynthese verantwortlicher Translations-Inhibitor nachweisbar ist. Als wahrscheinlichste Deutung lassen die Ergebnisse einen spezifischen Histon-mRNA destabilisierenden Faktor zu, z.B. eine Nuklease oder einen Nuklease-Aktivator, der nur unter folgenden Bedingungen auftritt: a) Hemmung (oder Ende) der DNA-Synthese und b) intakte Proteinsynthese.

VI Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
CM-	Carboxymehyl-
cpm	Impulse pro Minute
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
poly-(A)	Poly-adenyl-säure
RNA	Ribonucleinsäure
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
mRNA	messenger RNA
S	Sedimentationskonstante
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

VII Literaturverzeichnis

Adams, R.L.P. und J.G. Lindsay, 1967.
Hydroxyurea: Reversal of Inhibition and Use as a Cell-Synchronizing Agent. J. Biol. Chem. 242, 1314-1317.

Adamson, S.D., E. Herbert und W. Godchaux, 1968.
Factor Affecting the Rate of Proteinsynthesis in Lysate Systems from Reticulocytes. Arch. Biochm. Biophys. 125, 671-683.

Adesnik, M. und J.E. Darnell, 1972.
Biogenesis and Characterization of Histone Messenger RNA in HeLa Cells. J. Mol. Biol. 67, 397-406.

Aviv, H., I. Boime und P. Leder, 1971.
Protein Synthesis Directed by Encephalomyocarditis Virus RNA: Properties of a Transfer RNA-Dependent System. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2303-2307.

Bailey, G.S. und G. Dixon, 1973.
Histone IIb1 from Rainbow Trout: Comparisen in Amino Acid Sequences with Calf Thymus IIb1. J. Biol. Chem. 248, 5463-5472.

Balkow, K., T. Hunt und R. Jackson, 1975.
Control of Protein Synthesis in Reticulocyte Lysates: The Effect of Nucleotide Triphosphates on Formation of the Translational Repressor. Biochm. Biophys. Res. Commun. 67, 366-375.

Bernardi, A., P.F. Spahr, 1972.
Nucleotide Sequence at the Binding Site for Coat Protein on RNA of Bacteriophage R17. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3033-3037.

Birnstiel, M.L., J. Telford, E. Weinberg und D. Stafford, 1974.
Isolation and Some Properties of Genes Coding for Histone Proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 2900-2904.

Birnstiel, M.L., W. Schaffner, K. Gross und J. Telford, 1976.
In: Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus P. Ts'o, ed. (New York and Amsterdam: Elsevier North-Holland).

Borun, T.W., M.D. Scharf und E. Robbins, 1967.
Rapidly Labeled Polyribosome-Associated RNA Having The Properties Of Histone Messenger. Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1977-1983.

Borun, T.W., F. Gabrielli, K. Ajiro, A. Zweidler und C. Baglione, 1975. Further Evidence of Transcriptional and Translational Control of Histone Messenger RNA during the HeLa S3 Cycle. Cell 4, 59-67.

Borun, T.W., K. Ajiro, A. Zweidler, T.W. Dolby und R.E. Stephens, 1977. Studies of Human Histone Messenger RNA. J. Biol. Chem. 252, 173-180.

Bos, E., W. Roskam und D. Gallwitz, 1976
Partial Purification and Characterization of Induvidual Histone Messenger RNAs from HeLa Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 404-410.

Breindl, M. und Gallwitz, D. 1973.
Identification of Histone mRNA in the Cytoplasm and Its Translation in a Rabbit-Reticulocyte Cell-Free System. Eur. J. Biochem. 32, 381-391.

Breindl, M. und D. Gallwitz, 1974.
On the Translational Control of Histone Synthesis: Quantitation of Biologically Active Histone mRNA from Synchronized HeLa Cells and Its Translation in Different Cell-Free System. Eur. J. Biochem. 45, 91-97.

Britten, R.J. und E.H. Davidson, 1971.
Repetitiv and non repetitiv DNA sequences and a speculaton on the origins evolutionary novelty. Quart. Rev. Biol. 46, 111-133.

Brown, G.E., B. Lebleu, M. Kawakita, S. Shaila, G.C. Sen und P. Lengyel, 1976. Increased Endonuclease Activity In An Extract From Mouse Ehrlich Ascites Tumor Cells Whitch Had Been Treated With A Partially Purified Interferon Preparation: Dependence On Double-Stranded RNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 114-122.

Butler, W.B. und G.C. Mueller, 1973.
Control of Histone Synthesis in HeLa Cells.
Biochimica et Biophysica Acta, 294, 481-496.

Carasco, L. und A.E. Smith, 1976.
Sodium ions and the shutt-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. Nature 264, 807-809.

Civelli, O., A. Vincent, J.F. Buri und K. Scherrer, 1976.
Evidence for a Translational Inhibitor Linked to Globin mRNA in Untranslated Free Cytoplasmic Messenger Ribonucleoprotein Complexes. FEBS LETTERS 72, 71-

Farquhar, M.N. und J. McCarthy, 1973.
Evolutionary Stability of the Histone Genes of Sea Urchin. Biochemistry 12, 4113-4122.

Farrell, P.J., K. Balkow, T. Hunt und R.J. Jackson, 1977.
Phosphorylation of Initiation Factor eIF-2 and the Control of Reticulocyte Protern Synthesis. Cell 11, 187-200.

Friedman, R.M., R.M. Esteban, D.H. Metz, D.R. Tovell und I.M. Kerr und R. Williamson, 1972. Translation of RNA by L cell extracts: Effect of interferon.
FEBS LETTERS 24, 273-277.

Gabrielli, F. und C. Baglioni, 1974.
Translation of Histone Messenger RNA by Homologous Cell-Free System from Synchronized HeLa Cells.
Eur. J. Biochem. 42, 121-128.

Galavazi, G.H. Schenk und D. Bootsma, 1965.
Synchronization of Mammalian Cells in Vitro by Inhibition of the DNA Synthesis. Experimental Cell Research 41, 428-437.

Gallwitz, D., G.C. Mueller, 1969a.
Histone Synthesis in vitro by Cytoplasmic Microsomes from HeLa Cells. Science 163, 1351-1353.

Gallwitz, D. und G.C. Mueller, 1969b.
Histone Synthesis in Vitro on HeLa Cell Microsomes.
J. Biol. Chem. 244, 5947-5952.

Gallwitz, D. und G.C. Mueller, 1970.
RNA From HeLa Microsomes With Properties of Histone Messenger. FEBS LETTERS 6, 83-85.

Gallwitz, D. und M. Breindl, 1972.
Synthesis of Histones in a Rabbit Reticulocyte Cell-Free System Directed by a Polyribosomal RNA Fraction from Synchronized HeLa Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1106-1111.

Gallwitz, D., 1975.
Kinetics of inaktivation of histone mRNA in the cytoplasm after inhibition of DNA replication in synchronised HeLa cells. Nature 257, 247-248.

Gallwitz, D., E. Bos und H. Stahl, 1977.
Translation of HeLa Cell Histone Messenger RNAs in Cell-Free Protein Synthesizing Systems from Rabbit Reticulocytes, HeLa Cells and Wheat Germ. Methods in Cell Biology Vol. XIX, 197-214, Stein, G. und Stein, J., eds., Academic Press, 1977 (in Vorbereitung).

Gallwitz, D., U. Traub und P. Traub, 1977.
Fate of Histone Messenger RNA in Mengovirus-Infected Ehrlich Ascites Tumor Cells. Eur. J. Biochem. 81, 387-394.

Gilbert, J.M. und W.F. Anderson, 1970.
Cell-Free Hemoglobin Synthesis. J. Biol. Chem. 245, 2342-2349.

Goldstein, E.S. und S. Penman, 1973.
Regulation of Protein Synthesis in Mammalian Cells: Further Studies on the Effect of Actinomycin D on Translation Control in HeLa Cells. J. Mol. Biol. 80, 243-254.

Greenberg, J.R., 1972.
High Stability of Messenger RNA in Growing Cultured Cells. Nature 240, 102-104.

Gross, K.W., M. Jacob-Lorena, C. Bablioni und P.R. Gross, 1973.
Cell-Free Translation of Maternal Messenger RNA from Sea Urchin Eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2614-2618.

Grunstein, M. und P. Schedl, 1976.
Isolation and Sequence Analysis of Sea Urchin (Lytechinus pictus) Histone H4 Messenger RNA. J. Mol. Biol. 104, 323-349.

Herrlich, P., H.J. Rahmsdorf, S.H. Pai und M. Schweiger, 1974.
Translational Control Induced by Bacteriophage T7. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1088-1092.

Hunter, T., T. Hunt, R.J. Jackson und H.D. Robertson, 1975.
The characteristics of inhibition of protein synthesis by doublestranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. J. Biol. Chem. 250, 409-417.

Jacob, E., G. Malacinski und M.L. Birnstiel, 1976.
Reitertion Frequency of the Histone Genes in the Genom of the Amphibian, Xenopus laevis. Eur. J. Biochem. 69, 45-54.

Jacobs-Lorena, M., C. Baglioni und T.W. Borun, 1972.
Translation of Messenger RNA for Histones from HeLa Cells by a Cell-Free Extract from Mouse Ascites Tumor. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2095-2099.

Kabat, D. und M.R. Chappell, 1977.
Competition between Globin Messenger Ribonucleic Acids for a Discriminating Initiation Factor. J. Biol. Chem. 252, 2684-2690.

Kedes, L.H. und P.R. Gross, 1969a.
Identification in Cleaving Embryos of Three RNA Species serving as Templates for the Synthesis of Nuclear Proteins. Nature 223, 1335-1339.

Kedes, L.H. und P.R. Gross, 1969b.
Synthesis and Function of Messenger RNA during Early Embryonic Development. J. Mol. Biol. 42, 559-575.

Kedes, L.H. und M.L. Birnstiel, 1971.
Reiteration and Clustering of DNA Sequences Complementary to Histone Messenger RNA. Nature New Biology 230, 165-169.

Kedes, L.H., R.H. Cohn, J.C. Lowry, A.C.Y. Chang und S.N. Cohen, 1975. The Organization of Sea Urchin Histone Genes. Cell 6, 359-369.

Kedes, L.H., 1976.
Histone Messengers and Histone Genes. Cell 8, 321-331.

Kennedy, D.S. und St.M. Heywood, 1976.
The Role of Muscle and Reticulocyte Initiation Faktor 3 on the Translation of Myosin and Globin Messenger RNA in a Wheat Germ Cell-Free System. FEBS LETTERS 72, 314-318.

Kolakofsky, D. und C. Weissmann, 1971.
Possible Mechanism for Transition of Viral RNA from Polysome to Replication Complex. Nature New Biology 231, 42-46.

Laemmli, U.K., 1970.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bakteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Laskey, R.A. und A.D. Mills, 1975.
Quantitative Film Detection of ^{3}H and ^{14}C in Polyacrylamide Gels by Fluorography. Eur. J. Biochem. 56, 335-341.

Lebleu, B., G.S. Sen, S. Shaila, B. Cabrer und P. Lengyel, 1976. Interferon, double- stranded RNA, and protein phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 3107-3111.

Levenson, R.G. und K.B. Marcu, 1976.
On the Existens of Polyadenylated Histone mRNA in Xenopus laevis Oocytes. Cell 9, 311-322.

Levin, D.H., R.S. Ranu, V. Erst und I.M. London, 1976.
Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: Phosphorytation of methionyl-$tRNA_f$ binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from hemedeficient lysates. Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 3112-3116.

Levy, S., P. Wood, M. Grunstein und L. Kedes, 1975.
Individual Histone Messenger RNAs: Identification by Template Activity. Cell 4, 239-248.

Lifton, R.P., M.L. Goldgerg, R.W. Karp und D.S. Hognes, 1978.
The Organisation of the Histone Genes in Drosophila Melanogester: Functional and Evolutionary Implications. Cold Spring Harb, Symp. quant. Biol. 42 (in Vorbereitung).

Lodish, H.F. und N.D. Zinder, 1966.
Control Mechanisms for Phage-specific Syntheses. J. Mol. Biol. 19, 333-348.

Lodish, H.F. und M. Jacobsen, 1972.
Regulation of Hemoglobin Synthesis: Equal Rates of Translation and Termination of -Globin Chains. J. Biol. Chem. 247, 3622-3629.

Lodish, H.F., 1974.
Model for regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis. Nature 251, 385-388.

Lodish, H.F., 1976.
Translational Control of Protein Synthesis. in: Ann. Rev. Biochem. 1976, 39.72.

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr und R.J. Randall, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Marcu, K. und B. Dudock, 1974.
Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. Nucleic Acids Res. 1, 1385-1397.

Mathews, M.B. und A. Korner, 1970.
Mammalian Cell-Free Protein Synthesis Directed by Viral Ribonucleic Acid. Eur. J. Biochem. 17, 328-338.

Maxwell, C.R., C.S. Kamper, M. Rabinovitz, 1971.
Hemin control of globin synthesis: an assay for the inhibitor formed in the absence of hemin and some characteristics of its formation. J. Mol. Biol. 58, 317-327.

McCormick, W. und S. Penman, 1969.
Regulation of Protein Synthesis in HeLa Cells: Translation at Elevated Temperatures. J. Mol Biol. 39, 315-333.

McDowell, M.J., W.K. Jorlik, L. Villa-Komaroff und H.F. Lodish, 1972. Translation of Reovirus Messenger RNAs Synthesized In Vitro into Reovirus Polypeptides by Several Mammalian Cell-Free Extracts. Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2649-2653.

Melli, M., G. Spinelli und E. Arnold, 1977.
Synthesis of Histone Messenger RNA of HeLa Cells during the Cell Cycle. Cell 12, 167-174.

Moav, B. und M. Nehmer, 1971.
Histone Synthesis. Assignment to a Special Class of Polyribosomes in Sea Urchin Embryos. Biochemistry 10, 881-888.

Molloy, G.R., W. Jelinek, M. Salditt und J.E. Darnell, 1974. Arrangement of Specific Olinucleotides within (Poly(A) Terminated HnRNA Molecules. Cell 1, 43-53.

Nemer, M. und D.T. Lindsay, 1969.
Evidence that the s-polysomes of early sea urchin embryos may be responsible for the synthesis of chromosomal histones. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 156-160.

Palmiter, R.D., 1974.
Differential Rates of Initiation on Conalbumin and Ovalbumin Messenger Ribonucleic Acid in Reticulocyte Lysates. J. Biol. Chem. 249, 6779-6787.

Pardue, M.L., E. Weinberg, L.H. Kedes und M.L. Birnstiel, 1972. Localization of Sequences Coding for Histone Messenger RNA in the Chromosomes of Drosophila Melanogester M.L. J. Cell Biol. 55, 199a.

Perry, R.P. und D.E. Kelly, 1973.
Messenger RNA Turnover in Mouse L Cells. J. Mol. Biol. 79, 681-696.

Raff, R.A., H.V. Colot, S.E. Selvig und P.R. Gross, 1972.
Oogenetic Origin of Messenger RNA for Embryonic Synthesis of Microtubule Proteins. Nature 235, 211-

Ratner, L., G.C. Sen, G.E. Brown, B. Lebteu. M. Kawakita, B. Cabrer, E. Slattery und P. Lengyel, 1977.
Interferon, Double-Stranded RNA and RNA Degradation. Eur. J. Biochem. 79, 565-577.

Ray, P.N. und M.L. Pearson, 1975.
Functional inactivation of bacteriophage morphogenetic gene mRNA. Nature 253, 647-650.

Roberts, W.K., A. Hovanessian, R.E. Brown, M.J. Clemens und J.M. Kerr, 1976. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. Nature 264, 477-480.

Saborio, J.L., S.S. Pong und G. Koch, 1974.
Selective and Reversible Inhibition of Initiation of Protein Synthesis in Mammalian Cells. J. Mol. Biol. 85, 195-211.

Schochetman, G. und R.P. Perry, 1972.
Early Appearance of Histone Messenger RNA in Polyribosomes of Cultured L Cells. J. Mol. Biol. 63, 591-596.

Schochetman, G. und R.P. Perry, 1972.
Characterization of Messenger RNA Released from L Cells Polyribosomes as a Result of Temperature Shock. J. Mol. Biol. 63, 577-590.

Shutt, R.H. und L.H. Kedes, 1974.
Synthesis of Histone mRNA Sequences in Isolated Nuclei of Cleavage Stage Sea Urchin Embryos. Cell 3, 283-290.

Singer, R.H. und S. Penman, 1973.
Messenger RNA in HeLa Cells: Kinetics of Formation and Decay. J. Mol. Biol. 78, 321-334.

Stahl, H. und D. Callwitz, 1977.
Fate of Histone Messenger RNA in Synchronized HeLa Cells in the Absence of Initiation of Protein Synthesis. Eur. J. Biochem. 72, 385-392.

Stein, L.J., C.L. Thrall, W.D. Park, R.J. Mans und G.S. Stein, 1975. Hybridization Analysis of Histone Messenger RNA: Association with Polyribosomes During the Cell Cycle. Science 189, 557-558.

Stephens, R.E., C.J. Pan, K. Ajiro, T.W. Dolby und T.W. Borun, 1977. Studies of Human Histone Messenger RNA. J. Biol. Chem. 252, 166-172.

Studier, W., 1973.
Analysis of Bacteriophage T7 Early RNAs and Proteins on Slab Gels. J. Mol. Biol. 79, 237-248.

Sugiyama, T. und D. Nakada, 1968.
Translation Control of Bacteriophage MS2 RNA Cistrons by MS2 Coat Protein: Polyacrylamide Gel Electrophoretic Analysis of Proteins Synthesized in vitro.
J. Mol. Biol. 31, 431-440.

Weinberg, E.S., M.L. Birnstiel, I.F. Purdom, R. Williamson, 1972. Genes Coding for Polysomal 9S RNA of Sea Urchins: Conservation and Divergence. Nature 240, 225-228.

Weinberg, E.S., G.C. Overton, R.H. Shutt und R.H. Reeder, 1975. Histone gene arrangement in sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 4815-4819.

Weintraub, H., K. Palter und F. Van Lente, 1975. Histone H2a, H2b, H3 und H4 Form a Tetrameric Complex in Solutions of High Salt. Cell 6, 85-110.

van der Westhuyzen, D.R. und C. von Holt, 1971. A new procedure for the isolation and fractionation of histones. FEBS LETTERS 14, 333-337.

Wilson, M.C. und M. Melli, 1977. Determination of the Number of Histone Genes in Human DNA. J. Mol. Biol. 110, 511-535.

Zilberstein, A., P. Federman, L. Shulman und M. Revel, 1976. Spezific Phosphorylation In Vitro of a Protein Associated with Ribosomes of Interferon-Treated Mouse L Cells. FEBS LETTERS 68, 119-124.

Meine akademischen Lehrer waren:

Dehnike, Ebel, Eger, Haake, Hartke, Kating, Koransky, List, Mayer, Nultsch, Otto, Richter, Schiff, Schmitz, Seitz, Walcher, Willuhn

Azis, Beato, Braun, Gallwitz, Hensel, Karlson, v. Kraft, Niessing, Schachtschabel, Schneider, Schmid, Schwick, Seifart, Wiegandt.

Lebenslauf

30.1.1948	geboren in Heddinghausen als Sohn der Eheleute Sophie Stahl geb. Nolte und Franz Stahl
1954-1959	Besuch der Volksschule in Heddinghausen
1959-1968	Besuch des städtischen altsprachlichen Gymnasiums in Niedermarsberg
29.5.1968	Reifeprüfung
1968-1970	Pharmazeutisches Praktikum in der Raphael-Apotheke in Niedermarsberg
10.6.1970	Pharmazeutische Vorprüfung in Arnsberg
1970-1973	Studium der Pharmazie in Marburg
5.10.1973	Pharmazeutisches Staatsexamen
1973-1974	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
1974-1975	Mitarbeit an einem Forschungsprojekt zur Untersuchung des Stoffwechsels von Ecdyson in Insekten am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. P. Karlson
1.10.1975	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf – Telefon: 09545 / 8791